

Aus dem Zentrum für Innere Medizin,
Sektion Nephrologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger)

**VERBESSERUNG DER REINHEIT UND DER LAGERUNG
PHAGOZYTIERENDER ZELLEN AUS BLUTSPENDEN ZUR ANWENDUNG
IN DER HUMANMEDIZIN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Dipl. Biol. Stephanie Koch,
aus Rostock

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Steffen Mitzner
Universitätsmedizin Rostock
Zentrum für Innere Medizin, Sektion Nephrologie
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Volker Kiefel
Universitätsmedizin Rostock
Institut für Transfusionsmedizin
Ernst-Heydemann-Str. 6
18057 Rostock

3. Gutachter: OÄ Dr. med. Kathleen Selleng
Universitätsmedizin Greifswald
Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
Abt. Transfusionsmedizin
Ferdinand-Sauerbruch-Straße
17489 Greifswald

Einreichung der Dissertation: 17. April 2015

Verteidigung der Dissertation: 18. Mai 2016

Es gibt nichts Schöneres,
als geliebt zu werden,
geliebt um seiner selbst willen oder vielmehr trotz seiner selbst.
(Victor Hugo 1802–1885)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund	1
1.2 Hämatopoese	1
1.3 Das menschliche Immunsystem	2
1.4 Granulozyten - Zentrum der angeborenen Immunantwort	3
1.4.1 Morphologie	3
1.4.2 Ausgewählte Oberflächenstrukturen der neutrophilen Granulozyten	4
1.4.3 Neutrophile Granulozyten im Netzwerk von Entzündungsmediatoren	4
1.4.4 Mechanismen neutrophiler Granulozyten zur Pathogeneliminierung	6
1.5 Krankheitsbilder auf Basis defekter Granulozytenfunktion	9
1.6 Therapeutische Maßnahmen bei Granulozytopenie	10
1.6.1 Granulozytenkonzentrate (GK)	11
1.6.2 Granulozytentransfusion	12
1.6.3 Extracorporeal Immune Support System (EISS)	13
2 Ziel der Dissertation	15
3 Materialien und Methoden	16
3.1 Materialien	16
3.1.1 Verwendete Blutkomponenten und -präparate	16
3.2 Labormaterialien, Chemikalien und Reagenzien	17
3.3 Standard-Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Granulozyten-qualität	17
3.3.1 Automatisierte Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	18
3.3.2 Bestimmung des pH-Werts, der Elektrolyte und der Partialdrücke für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid	18
3.3.3 Probenvorbereitung für den kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay, die Bestimmung der Oxyburst-Aktivität mittels Chemilumineszenz und der Expression der Oberflächenmarker	19
3.3.4 Kombiniertes Phagozytose-Oxyburst-Assay	19
3.3.5 Bestimmung der Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD35, CD64 und CD89	21
3.3.6 Bestimmung der Oxyburst-Aktivität mittels Chemilumineszenz	22
3.3.7 Bestimmung der Glucose-, Laktat- und Laktatdehydrogenasekonzentration	23

3.3.8	Bestimmung ausgewählter Zytokine.....	24
3.4	Mikroskopische Methoden zur Beurteilung der Granulozytenmorphologie.....	24
3.4.1	Herstellung von Blutaussstrichen und Färbung nach Pappenheim.....	24
3.4.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen.....	25
3.4.3	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	25
3.5	Entwicklung des Aufreinigungsprozesses von Granulozytenkonzentrat.....	26
3.5.1	Stufe I - Downscaling Versuche.....	26
3.5.2	Stufe II - Upscaling Versuche.....	29
3.5.3	Stufe III - Versuche im geschlossenen System.....	30
3.6	Entwicklung der Lagerungsbedingungen.....	31
3.6.1	Temperatur	31
3.6.2	Bewegung.....	31
3.6.3	Zellkonzentration.....	31
3.6.4	Lagerungsbeutel	31
3.6.5	Lagerungsmedium	32
3.7	Statistik.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Charakterisierung der Standard-Granulozytenkonzentrate.....	34
4.2	Entwicklung des Aufreinigungsprozesses von Granulozytenkonzentrat.....	35
4.2.1	Stufe I - Downscaling Versuche.....	35
4.2.2	Stufe II - Upscaling-Versuche	39
4.2.3	Stufe III - Geschlossenes System.....	40
4.3	Entwicklung der Lagerungsbedingungen für gereinigte Granulozytenkonzentrate.....	48
4.3.1	Vergleich unterschiedlicher Lagerungstemperaturen	49
4.3.2	Vergleich der Lagerung mit und ohne Bewegung	52
4.3.3	Vergleich der Lagerung bei unterschiedlichen Leukozytenkonzentrationen.....	57
4.3.4	Vergleich der Lagerung in unterschiedlichen Lagerungsbeuteln	63
4.3.5	Vergleich zwischen unfiltriertem und filtriertem CPD-Plasma als Lagerungsmedium	69
5	Diskussion.....	81
5.1	Granulozytenkonzentrate – Status Quo.....	81
5.2	Sedimentation mit Hydroxyethylstärke und Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung reduzieren den Anteil an Erythrozyten und Thrombozyten signifikant.....	83
5.3	Lagerung von gereinigten Granulozytenkonzentraten bis zu 72 Stunden möglich.....	90
5.4	Ausblick	101
6	Zusammenfassung.....	102
7	Literaturverzeichnis	104

8	wissenschaftliche Beiträge	113
8.1	Publikationen	113
8.2	Patente	113
8.3	Poster	113
8.4	Vorträge	113
9	Anhang	114
9.1	Labormaterialien, Chemikalien und Reagenzien	114
9.1.1	Laborverbrauchsmaterialien	114
9.1.2	Chemikalien und Reagenzien	114
9.1.3	Antikörper für Oberflächenmarker-Analyse	116
9.1.4	ELISA-Kits zur Zytokin-Bestimmung	116
9.1.5	Testkits für den kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay	116
9.2	Geräte	117
9.3	Charakterisierung der verwendeten Standard-Granulozytenkonzentrate	118
9.4	Stufe I - Downscaling Versuche	120
9.4.1	Verhältnis zwischen Granulozytenkonzentrat und Hydroxyethylstärke	120
9.5	Stufe II - Upscaling-Versuche	121
9.6	Vergleich zwischen unfiltriertem und filtriertem CPD-Plasma als Lagerungsmedium	122
9.6.1	Vergleich der Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD35, CD64 und CD89 während der Lagerung	122
9.6.2	Vergleich der Expression des Oberflächenmoleküls CD95 während der Lagerung (Apoptose)	123
9.6.3	Vergleich der Sekretion ausgewählter Zytokine während der Lagerung	123
10	Eidesstattliche Erklärung	124

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Vereinfachtes Schema der Hämatopoese.....	2
Abb. 2	(A) Lichtmikroskopische Aufnahme (400x), (B) Transmissionselektronische Aufnahme (1400x) und (C) Rasterelektronische Aufnahme (6750x) eines humanen neutrophilen Granulozyts.....	4
Abb. 3	Schematische Darstellung der Phagozytose	6
Abb. 4	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Neutrophil Extracellular Traps (NETs)	8
Abb. 5	Schematische Darstellung vom Extracorporeal Immune Support System EISS.....	13
Abb. 6	Übersicht des verwendeten Probenmaterials	17
Abb. 7	Auswertungsvorlage für den kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay	21
Abb. 8	Auswertungsvorlage für die Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen ..	22
Abb. 9	Pipettierschema für die Messung der Oxyburst-Aktivität mittels Chemilumineszenz	23
Abb. 10	Versuchsaufbau zur Testung des optimalen GK-HES-Volumenverhältnisses	27
Abb. 11	Abdrücken des leukozytenhaltigen Überstandes in ein Zentrifugationsröhrchen.....	28
Abb. 12	Versuchsaufbau für die Sedimentationsphase während der Upscaling-Versuche.....	29
Abb. 13	Entwicklungsschema des Aufreinigungsprozesses für Granulozytenkonzentrate	30
Abb. 14	Entwicklungsschema der Lagerung gereinigter Granulozytenkonzentrate	32
Abb. 15	Schematische Darstellung der drei Entwicklungsstufen der Aufreinigung	35
Abb. 16	Prozentualer Anteil der (A) verschiedenen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen nach Aufreinigung mit einfacher Sedimentation oder Zentrifugation.....	36
Abb. 17	(A) Prozentualer Anteil der Blutbestandteile (GK = 100 %) und (B) Vitalität der Leukozyten nach Aufreinigung mit unterschiedlichen Granulozytenkonzentrat-Hydroxyethylstärke-Verhältnissen.....	37
Abb. 18	Prozentualer Anteil der (A) einzelnen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen im gereinigten Granulozytenkonzentrat nach Aufreinigung im GK-HES-Verhältnis 1:0,5... ..	38
Abb. 19	Prozentualer Anteil der (A) verschiedenen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen nach Aufreinigung mit Infukoll® HES 6 % Mw 200.000 bzw. Mw 450.000	39
Abb. 20	Prozentualer Anteil der (A) einzelnen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen im gereinigten Granulozytenkonzentrat nach Aufreinigung durch Sedimentation im Spendenbeutel.....	40
Abb. 21	Prozentualer Anteil der (A) einzelnen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen im gereinigten Granulozytenkonzentrat	41
Abb. 22	(A) Glukose-, (B) Laktat-, (C) LDH-Konzentration, (D) pH-Wert und (E, F) Partialdrücke der Blutgase der Granulozytenkonzentrate vor und nach der Aufreinigung im geschlossenen System.....	43

Abb. 23	(A) Prozentualer Anteil an phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen aufs GK (100 %); (C) prozentualer Anteil an Oxyburst-aktiven Granulozyten und (D) deren Oxyburst-Leistung nach Aufreinigung im geschlossenen System	44
Abb. 24	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (400x) von phagozytierenden Granulozyten aus dem (A) Standard-Granulozytenkonzentrat (GK) bzw. (B) gereinigten Granulozytenkonzentrat	44
Abb. 25	(A) Lichtmikroskopische (400x), (C) rasterelektronenmikroskopische (6750x) und (E) transmissionselektronenmikroskopische (900x) Aufnahme eines Standard-Granulozyten-konzentrates; (B) Lichtmikroskopische (400x), (D) rasterelektronenmikroskopische (6750x) und (F) transmissionselektronenmikroskopische (900x) Aufnahme eines gereinigten Granulozytenkonzentrates.....	47
Abb. 26	Schematische Darstellung der Entwicklung der Lagerungsbedingungen für gereinigte Granulozytenkonzentrate	48
Abb. 27	(A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei 4 °C, Raumtemperatur (RT) und 37 °C über 72 Stunden.....	49
Abb. 28	(A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK (100 %) bei 4 °C, Raumtemperatur (RT) und 37 °C über 72 Stunden	50
Abb. 29	(A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei 4 °C, Raumtemperatur (RT) und 37 °C über 72 Stunden	51
Abb. 30	Oxyburst-Aktivität der Granulozyten mittels Chemilumineszenz-Assay mit (A) Luminol und (B) Lucigenin bezogen auf das GK bei 4 °C, Raumtemperatur (RT) und 37 °C über 72 Stunden.....	52
Abb. 31	Plasmabeutel mit gereinig-tem Granulozytenkonzentrat nach Lagerung (A) ohne Bewegung und (B) mit Bewegung	53
Abb. 32	(A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden	54
Abb. 33	LDH-Konzentration bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden.....	54
Abb. 34	(A) Glucose- und (B) Laktatkonzentration bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden.....	55
Abb. 35	(A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden	56
Abb. 36	(A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und deren Leistung/Aktivität mittels (B) kombiniertem Phagozytose-Oxyburst-Assay bzw. Chemilumineszenz-Assay mit (C) Luminol und (D) Lucigenin bezogen auf das GK bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden	57
Abb. 37	(A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden.....	58

Abb. 38	LDH-Konzentration bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden.....	59
Abb. 39	Partialdrücke für (A) Sauerstoff und (B) Kohlenstoffdioxid bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden.....	59
Abb. 40	(A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden.....	60
Abb. 41	(A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und deren Leistung/Aktivität mittels (B) kombiniertem Phagozytose-Oxyburst-Assay bzw. Chemilumineszenz-Assay mit (C) Luminol und (D) Lucigenin bezogen auf das GK bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden	61
Abb. 42	(A) Glucose- und (B) Laktatkonzentration bei Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden	62
Abb. 43	pH-Wert der Lagerungsansätze bei niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden.....	63
Abb. 44	pH-Wert der Leukozytensuspension, gelagert in Plasmabeuteln bzw. Thrombozytenlagerungs-beuteln über 72 Stunden	64
Abb. 45	Partialdrücke für (A) Sauerstoff und (B) Kohlenstoffdioxid bei der Lagerung in Plasmabeuteln bzw. Thrombozytenlagerungsbeuteln über 72 Stunden	64
Abb. 46	(A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei der Lagerung im Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel über 72 Stunden.....	65
Abb. 47	LDH-Konzentration bei der Lagerung in Plasmabeuteln bzw. Thrombozytenlagerungsbeuteln über 72 Stunden	66
Abb. 48	(A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei der Lagerung im Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel über 72 Stunden.....	67
Abb. 49	(A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und deren Leistung/Aktivität mittels (B) kombiniertem Phagozytose-Oxyburst-Assay bzw. Chemilumineszenz-Assay mit (C) Luminol und (D) Lucigenin bezogen auf das GK bei der Lagerung im Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel über 72 Stunden	68
Abb. 50	(A) Glucose- und (B) Laktatkonzentration bei der Lagerung im Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel über 72 Stunden	69
Abb. 51	(A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei der Lagerung mit unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden.....	70
Abb. 52	LDH-Konzentration bei der Lagerung in mit unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden	70
Abb. 53	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der, mit ungefiltertem CPD-Plasma (B-D) bzw. filtriertem CPD-Plasma (E-G) gelagerten Leukozyten.....	72

Abb. 54	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (900x) der, mit ungefiltertem CPD-Plasma (B-D) bzw. filtertem CPD-Plasma (E-G) gelagerten Leukozyten	73
Abb. 55	(A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei der Lagerung mit unfiltertem bzw. filtertem CPD-Plasma über 72 Stunden...	74
Abb. 56	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (600x) von phagozytierenden Granulozyten (A) zu Beginn der Lagerung und nach 72-stündiger Lagerung in (B) unfiltertem bzw. (C) filtertem CPD-Plasma	75
Abb. 57	(A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und deren Leistung/Aktivität mittels (B) kombiniertem Phagozytose-Oxyburst-Assay bzw. Chemilumineszenz-Assay mit (C) Luminol und (D) Lucigenin bezogen auf das GK bei der Lagerung mit ungefiltertem bzw. gefiltertem CPD-Plasma über 72 Stunden	77
Abb. 58	(A) Glucose- und (B) Laktatkonzentration bei der Lagerung mit unfiltertem bzw. filtertem CPD-Plasma über 72 Stunden	78
Abb. 59	pH-Wert der Leukozytensuspension, gelagert mit unfiltertem bzw. filtertem CPD-Plasma über 72 Stunden	78
Abb. 60	Partialdrücke für (A) Sauerstoff und (B) Kohlenstoffdioxid bei der Lagerung in Plasmabeuteln bzw. Thrombozytenlagerungsbeuteln über 72 Stunden	79
Abb. 61	(A) Vitalität der Leukozyten, (B) LDH-Konzentration, (C) Prozentualer Anteil an phagozytierenden Granulozyten und (D) deren Leistung bezogen aufs GK (100 %); (E) prozentualer Anteil an Oxyburst-aktiven Granulozyten und (F) deren Oxyburst-Leistung bezogen aufs GK (100 %) nach der Aufreinigung.....	120
Abb. 62	(A) Vitalität der Leukozyten, (B) LDH-Konzentration, (C) Prozentualer Anteil an phagozytierenden Granulozyten und (D) deren Leistung bezogen aufs GK (100 %); (E) prozentualer Anteil an Oxyburst-aktiven Granulozyten und (F) deren Oxyburst-Leistung bezogen aufs GK (100 %) nach der Aufreinigung direkt im Spendenbeutel	121
Abb. 63	Anteil der Granulozyten, die Oberflächenmarker exprimieren bei der Lagerung mit (A) unfiltertem bzw. (B) filtertem CPD-Plasma über 72 Stunden und die Menge der exprimierten Oberflächenmoleküle bezogen auf das GK bei der Lagerung mit (C) unfiltertem bzw. (D) filtertem CPD-Plasma über 72 Stunden.....	122
Abb. 64	(A) Anteil der CD95 exprimierenden Granulozyten bei der Lagerung mit unfiltertem bzw. filtertem CPD-Plasma über 72 Stunden und (B) die Menge des exprimierten Oberflächenmoleküls CD95 bezogen auf das GK bei der Lagerung mit unfiltertem bzw. filtertem CPD-Plasma über 72 Stunden	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Inhaltsstoffe der Granula (Auswahl)	3
Tab. 2	Ausgewählte Oberflächenstrukturen und deren Funktion(en)	4
Tab. 3	Übersicht der wichtigsten Zytokine und Lipidmediatoren	5
Tab. 4	Auswahl von Krankheitsbildern mit Granulozytendysfunktion oder Neutropenie	9
Tab. 5	Prüfkriterien der Spendertauglichkeit	11
Tab. 6	Pipettierschema des kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assays	20
Tab. 7	In downscaling-Versuchen getestete HES-Granulozytenkonzentrat-Verhältnisse	27
Tab. 8	Zusammenfassung des Volumens, der zellulären (Gesamtzellzahl/GK, Hämatokrit, Vitalität) und funktionellen (Anteil der phagozytierenden bzw. Oxyburst-aktiven Zellen) Parameter der verwendeten Standard-Granulozytenkonzentrate	34
Tab. 9	Zusammenfassung des prozentualen Anteils der exprimierenden Monozyten und Granulozyten und der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bezogen auf 100 % MFI des GK vor und nach der Aufreinigung im geschlossenen System	45
Tab. 10	Charakterisierung der Granulozytenkonzentrate - Übersicht aller verwendeten Granulozytenkonzentrate	118
Tab. 11	Zusammenfassung der Plasmakonzentrationen [pg/ml] für die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ und TNF- α während der Lagerung in unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden	123

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	<u>A</u> bbildung
ADCC	<u>a</u> ntibody- <u>d</u> e <u>p</u> endent <u>c</u> ellular <u>c</u> ytotoxicity - antikörperabhängige Zytotoxizität
AG	<u>A</u> ntigen
AK	<u>A</u> ntikörper
Aqua dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata - destilliertes Wasser
Bsp.	<u>B</u> eispiel
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise
c.a.	<u>c</u> irca
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation - System zur Bezeichnung zellulärer Differenzierungs- antigene
CML	<u>c</u> hronische <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
CMV	(Humanes) <u>C</u> ytomegalie- <u>V</u> irus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	Antikoagulanz-Stabilisator-Lösung mit <u>C</u> itrat, <u>P</u> hosphat und <u>D</u> extrose
CR	<u>c</u> omplement <u>r</u> eceptor - Komplementrezeptor
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidin-2-phenylindol
d. h.	<u>d</u> as <u>h</u> eißt
DHR	<u>D</u> ihydro <u>r</u> hodamin
DMSO	<u>D</u> imethylsulf <u>o</u> xid
EISS	<u>e</u> xtracorporeal <u>i</u> mmune <u>s</u> upport <u>s</u> ystem - Extrakorporales Immununterstützungssystem
FACS	<u>f</u> luorescence- <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting - Fluoreszenzbasierte Zellsortierung
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocyanat
G-CSF	<u>g</u> ranulocyte- <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor - Granulozyten-Wachstumsfaktor
GK	<u>G</u> ranulozyten <u>k</u> onzentrat(e)
gGK	gereinigte(s) <u>G</u> ranulozyten <u>k</u> onzentrat(e)
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HES	<u>H</u> ydroxyethyl <u>s</u> tärke
HLA	<u>h</u> uman <u>l</u> eukocyte <u>a</u> ntigen - Humanes Leukozyten Antigen

ICAM	<u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule - interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICU	<u>i</u> ntensive <u>c</u> are <u>u</u> nit - Intensivmedizinische Station
Ig	<u>I</u> mmunglobulin
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
M	<u>M</u> arker
Mac-1	Makrophagen-1 Antigen
MCV	<u>m</u> ean <u>c</u> ellular <u>v</u> olume - mittleres erythrozytäres Volumen
MFI	<u>m</u> ittlere <u>F</u> luoreszenzintensität
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Maßeinheit für Partialdrücke)
MODS	<u>m</u> ultiple <u>o</u> rgan <u>d</u> ysfunction <u>s</u> yndrome - Syndrom mit multiplen Organfehlfunktionen
MOF	<u>m</u> ultiple <u>o</u> rgan <u>f</u> ailure - Multiples Organversagen
Mw	<u>m</u> olecular <u>w</u> eight - Molekülgewicht
NaCl	<u>N</u> atrium <u>c</u> hlorid
NADPH	<u>N</u> icotinamid <u>a</u> denin <u>d</u> inukleotid <u>p</u> hosphat
n. d.	<u>n</u> icht <u>d</u> okumentiert
NETs	<u>n</u> eutrophil <u>e</u> xtracellular <u>t</u> raps - neutrophile extrazelluläre Fangmatrix
O ₂	Sauerstoff
PAMP	<u>p</u> athogen <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern - Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline - Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	<u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
PRR	<u>p</u> athogen <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptor - Pathogen-Erkennungsrezeptor
PMN	<u>p</u> olymorphonuclear leukocyte - Polymorphkerniger Leukozyt
R	<u>R</u> egion
REM	<u>R</u> asterelektronen <u>m</u> ikroskopie
Rh	<u>R</u> hesus-Faktor
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies - reaktive Sauerstoffspezies

RT	Raumtemperatur
s.c.	<u>s</u> ub <u>c</u> utan
SIRS	<u>s</u> ystemic <u>i</u> nflammatory <u>r</u> esponse <u>s</u> yndrome - systemische Entzündungsreaktion
SOP	<u>s</u> tandard <u>o</u> perating <u>p</u> rocedure - Standardarbeitsanweisung
TEM	<u>T</u> ransmissions <u>e</u> lektronen <u>m</u> ikroskopie
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike- <u>R</u> ezeptor
TNF- α	<u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor- α - Tumornekrosefaktor- α
TRITC	<u>T</u> etramethyl <u>r</u> hodamin <u>i</u> so <u>t</u> hiocyanat
Vgl.	<u>V</u> ergleich
vs.	<u>v</u> ers <u>s</u>

1 Einleitung

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten sind Zellen der angeborenen Immunität. Durch ihre gute Mobilität, die Fähigkeit nach Aktivierung aus dem Blutkreislauf ins Gewebe einzuwandern und die mannigfaltigen Mediator- und Effektormechanismen, spielen sie eine Schlüsselrolle in der Abwehr von bakteriellen, viralen und eukaryotischen Krankheitserregern. Sie sind aber auch in der Lage, geschädigte körpereigene Zellen nach diversen Traumata zu erkennen und zu eliminieren. Eine Störung dieser Zellpopulation, wie eine Neutropenie (stark minimierte Neutrophilenzellzahl) und ihrer Funktionen geht oft mit schweren und lebensbedrohlichen Infektionen einher.

Eine mögliche therapeutische Maßnahme zur Behandlung schwerer Neutropenien ist die Transfusion von Granulozytenkonzentraten. Da diese Blutpräparate patientenspezifisch hergestellt werden, ist neben einer zeitnahen Rekrutierung eines AB0-kompatiblen Spenders auch dessen kostenintensive Konditionierung mit granulozytenmobilisierenden Medikamenten im Vorfeld (beginnend ca. 18 Stunden vor der Spende) der ca. zweistündigen Apherese notwendig. Auf Grund der zeitaufwendigen Vorbereitungen und Herstellung ist eine schnelle Versorgung von Risiko- und Notfallpatienten nicht möglich. Ein zweiter anwendungslimitierender Fakt ist, dass trotz des angewendeten Spendeverfahrens, die Granulozytenkonzentrate keine hochreinen Zellsuspensionen sind. Sie enthalten ebenfalls eine große Menge an anderen leukozytären Subpopulationen (Monozyten, Lymphozyten) sowie Erythrozyten und Thrombozyten. Da diese Zellarten unterschiedliche Lagerungsbedingungen benötigen, sind Granulozytenkonzentrate nur minimal lagerungsfähig und müssen unmittelbar, beziehungsweise am Herstellungstag, dem Patienten transfundiert werden.

Ziel dieser wissenschaftlichen Forschungsarbeit, die in Kooperation mit der Firma Artcline GmbH (Rostock) und dem Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt wurde, war es, eine Möglichkeit zu entwickeln, lagerfähige Granulozytenkonzentrate für die therapeutische Anwendung in der Humanmedizin herzustellen.

1.2 Hämatopoese

Die ab Geburt im Knochenmark stattfindende Hämatopoese ist die dauerhafte Produktion der im Blut vorkommenden zellulären Bestandteile. Ausgehend von einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle werden unter dem Einfluss verschiedener hämatopoetischer Wachstumsfaktoren lymphatische oder myeloische Vorläuferzellen gebildet. Über verschiedene Differenzierungs- und Reifungsschritte entstehen aus den myeloischen Vorläuferzellen dann die Erythrozyten (rote Blutzellen), Thrombozyten (Blutplättchen), Monozyten und neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Die lymphatischen Vorläuferzellen sind der Ausgangspunkt für die späteren reifen T- und B-Lymphozyten und die NK-Zellen („natural killer“).

Abb. 1 zeigt in vereinfachter Form das Schema der Hämatopoese mit den wichtigsten Zwischenstufen und Vorläuferzellen.

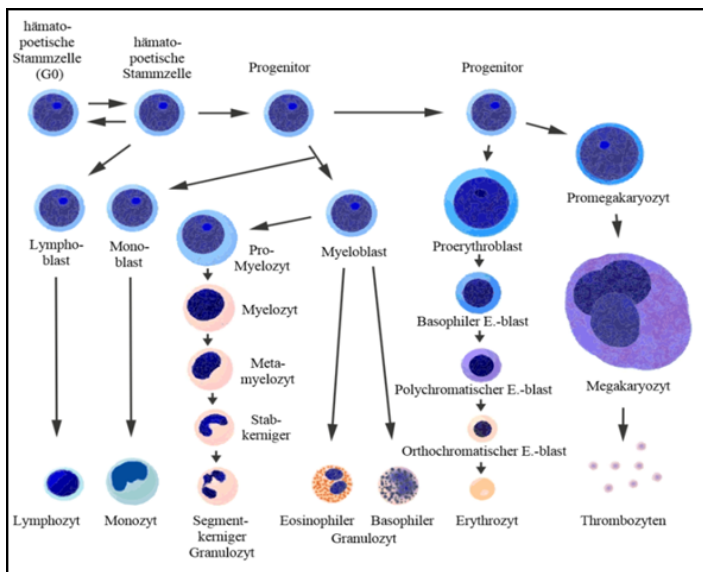


Abb. 1 Vereinfachtes Schema der Hämatopoese [1]

Die reifen Zellen, die aus den myeloischen Vorläuferzellen entstanden, sind funktionelle Endzellen, das heißt, sie haben die Fähigkeit zur Proliferation (Zellteilung) verloren und gehen nach unterschiedlich langer Lebensdauer zugrunde. Durch eine ständige Neubildung an Blutzellen kann der Körper auf diesen Verlust oder auf akute Situationen, die einen veränderten Bedarf an Blutzellen zur Folge haben, dynamischen reagieren.

1.3 Das menschliche Immunsystem

Der menschliche Organismus besitzt eine Vielzahl von Schutz- und Verteidigungsmechanismen, um sich gegen schädliche Einflüsse aus der Umwelt zu schützen. Neben den mechanischen und chemischen Barrieren der Körperoberfläche (Schweiß, Schleim, Epithelien und Membranen) hat sich ein komplexes Netzwerk aus immunkompetenten Zellen, den Leukozyten, und humoralen Faktoren, das Immunsystem, entwickelt. Dabei unterscheidet man generell zwei Funktionskreise:

Bei der **nativen (angeborenen) Immunantwort** beginnen die Zellen der myeloischen Reihe (Granulozyten, Monozyten/Makrophagen) innerhalb weniger Stunden nach dem Kontakt und der Erkennung des Erregers anhand dessen Grundmusters, diesen zu bekämpfen. Es ist kein vorheriger „Erstkontakt“ für die Aktivierung der Immunabwehr nötig.

Die **adaptive (erworbene) Immunabwehr** basiert auf der zeitverzögerten Aktivierung und Bindung von bestimmten Fremdstrukturen (Antigene, AG) durch humorale und zellständige Antikörper (AK), die von den T- und B-Lymphozyten zur Verfügung gestellt werden. Durch Rekombination und Mutation der Grundmuster während der somatischen Zelldifferenzierung erhöht sich die Zahl der Erkennungsmöglichkeiten, die nach dem Erstkontakt im „immunologischen Gedächtnis“ abgespeichert wurden, um ein Vielfaches. Dadurch kommt es in den meisten Fällen zu einem lebenslangen Schutz vor erneuten Infektionen mit den „gespeicherten“ Antigenen.

1.4 Granulozyten - Zentrum der angeborenen Immunantwort

1.4.1 Morphologie

Granulozyten entstammen der myeloischen Blutzellbildung und haben im reifen Stadium einen Durchmesser von 12-15 µm. Während sie im Blutstrom zirkulieren sind sie rund, können sich aber auf Grund ihres Zytoskeletts, dessen wesentliche Bestandteile Actin und Myosin sind, nach Kontakt mit festen Partikeln oder Oberflächen amöboid durch Ausbildung von Pseudopodien fortbewegen.

Bei den Granulozyten unterscheidet man drei Typen: neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Die Neutrophilen bilden mit 55-65% aller Granulozyten die größte Subpopulation gefolgt von den Eosinophilen mit 2-4% und den Basophilen mit 0,5-1%. Diese „klassische“ Unterscheidung und Namensgebung geht auf die unterschiedliche Färbbarkeit der beiden lichtmikroskopisch erkennbaren lysosomalen Granulatypen mittels sauer-basischen Farbstoffgemischen nach Romanovsky zurück. Während **azurophile Granula** rötlich-violett erscheinen, sehen **spezifische Granula** eher lachsfarben aus. Die **tertiären Granula** und **sekretorischen Vesikel** haben Dimensionen, die nur in der Elektronenmikroskopie sichtbar sind. Die vier Granulatypen unterscheiden sich auch in ihren enthaltenen Substanzen und den damit definierten Aufgabenbereich. Während azurophile Granula hoch effektive Enzyme zur Erregerzerstörung enthalten, nimmt der Besatz mit Oberflächenstrukturen wie Rezeptoren und Adhäsinen von den spezifischen Granula zu den sekretorischen Vesikeln zu und der Enzymgehalt ab [2; 3]. Sie sind somit für die Erneuerung und Bereitstellung spezifischer Strukturen auf der Zellmembran zuständig. Eine Auswahl von prominenten Inhaltsstoffen der Granula wurde in Tab. 1 zusammengefasst.

Tab. 1 Inhaltsstoffe der Granula (Auswahl) [4]

Azurophile Granula (primäre)	Spezifische Granula (sekundäre)	Tertiäre Granula	Sekretorische Vesikel
<u>Matrix</u> Glycosidasen Phosphatasen Elastasen Kollagenasen Lysozym Phospholipase A2 Nucleotidasen Myeloperoxidase	<u>Matrix</u> Histaminase Lysozym Gelatinase Kollagenase Laktoferrin IL-8, IL-12 <u>Membran</u> NADPH-Oxidase (Cytochrom b) CD11b ICAM3	<u>Matrix</u> Gelatinase Lysozym <u>Membran</u> CD11b Cytochrom b CD35 CD14 CD16	<u>Matrix</u> Plasmaproteine Albumin <u>Membran</u> Cytochrom b CD11b CD14 CD16

Der Zellkern von Granulozyten ist typischer Weise mehr oder weniger stark in 2-4 (selten 5) Untereinheiten segmentiert [5]. Aufgrund der prägnanten Ausprägung dieser morphologischen

Besonderheit hat sich für die neutrophilen Granulozyten auch die englischsprachige Bezeichnung „polymorphonuclear leukocyte“ und deren Abkürzung „PMN“ eingebürgert.

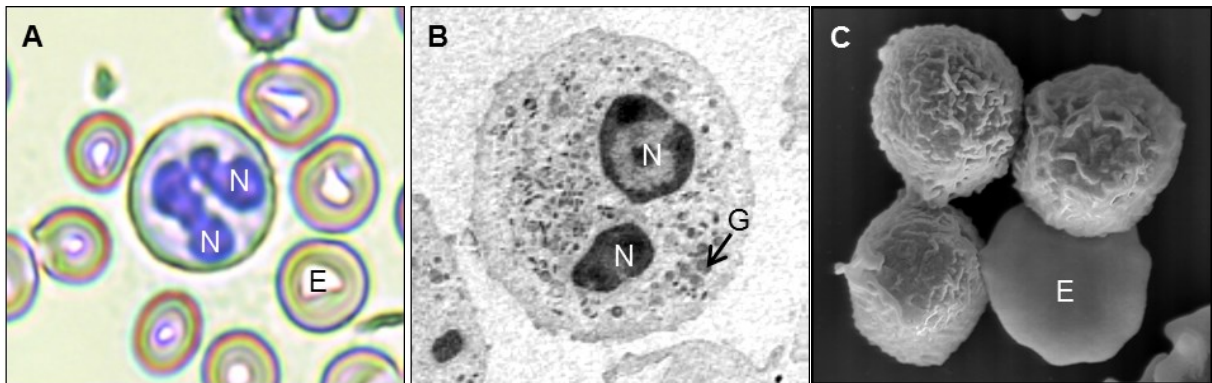


Abb. 2 (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (400x), (B) Transmissionselektronische Aufnahme (1400x) und (C) Rasterelektronische Aufnahme (6750x) eines humanen neutrophilen Granulozyts. (N = Zellkern; G = spezifische Granula; E = Erythrozyten) - In Zusammenarbeit mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universitätsmedizin Rostock

1.4.2 Ausgewählte Oberflächenstrukturen der neutrophilen Granulozyten

Zu den immunzytologischen Hauptfunktionen der neutrophilen Granulozyten gehören die Phagozytose und Eliminierung von pathogenen Mikroorganismen. Um dies wirkungsvoll durchführen zu können, müssen die PMN an den Ort der Infektion (Emigration) wandern und die Erreger an der Zelloberfläche binden. Hierfür sind neben den in den enzymhaltigen Granula eine Vielzahl von Oberflächenstrukturen wie Adhäsionsmoleküle (Integrine, etc.), Komplementrezeptoren (CR), Fc-Rezeptoren (FcR) und Bindungsstellen für Fremdstrukturen von Bedeutung. Eine Übersicht ausgewählter granulozytärer/monozytärer Oberflächenstrukturen ist in Tab. 2 wiedergegeben [6].

Tab. 2 Ausgewählte Oberflächenstrukturen und deren Funktion(en)

Oberflächenstruktur	Ligand	Funktion
CD11b/CD18 (CR3) CD11c/CD18 (CR4)	ICAM-1 und ICAM-2, iC3b	Haftung („sticking“) von PMN an Endothelzellen mit anschließender Emigration zum Entzündungsherd; Phagozytoseaktivierung
CD14 (Co-Rezeptor v. TLR4)	LPS	Phagozytoseaktivierung; Stimulation der angeborenen Immunantwort gg. LPS
CD16 (FcγR III)	Fc-Region von IgG	Phagozytoseaktivierung; Zellaktivierung; ADCC
CD35 (CR1)	C3b, C4b, iC3b	Phagozytoseaktivierung
CD64 (FcγR I)	IgG	Phagozytoseaktivierung; Stimulation der Immunantwort
CD89 (FCαR)	IgA1, IgA2	Phagozytoseaktivierung; Zellaktivierung; ADCC

1.4.3 Neutrophile Granulozyten im Netzwerk von Entzündungsmediatoren

An der Entzündungsreaktion im Menschen sind neben den Immunzellen auch diverse andere Zelltypen beteiligt. Ein Kommunikationssystem aus verschiedenen Mediatoren wie Lipiden, Produkten der Komplementaktivierung und Zytokinen koordiniert die beteiligten Zellen.

Zytokine sind niedermolekulare Proteine, die von verschiedensten Zelltypen produziert und sezerniert werden. Sie können sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken. Chemokine sind eine Untergruppen der Zytokine, deren Aufgabenbereich die gezielte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung beinhaltet. Durch ihre Hauptfunktionen sind neutrophile Granulozyten ein zentrales Glied in der Abfolge der Entzündungsreaktion und werden durch eine Vielzahl von Mediatoren in ihrer Aktivität beeinflusst. So führen Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 (IL-8) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), aber auch Leukotrien B4 (LTB4) und der Komplementfaktor 5a zu einer gezielten Einwanderung von PMN in das entzündete Gewebe [7]. Neutrophile sind aber auch in der Lage, verschiedene Zytokine und Lipidmediatoren zu generieren, an die Umgebung abzugeben und somit gezielt Einfluss auf den Entzündungsverlauf zu nehmen. Eine Übersicht der wichtigsten pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokine und Lipidmediatoren und deren Funktionsweise ist in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3 Übersicht der wichtigsten Zytokine und Lipidmediatoren [8; 9; 10; 11]

Bezeichnung	Abkürzung	Wirkungsweise
<i>Proinflammatorische Zytokine</i>		
Interleukin-1 β	IL-1 β	Granulozytenmobilisierung im Knochenmark; Chemotaxis; Fieber
Interleukin-6	IL-6	Induktion unspezifischer Entzündungsreaktionen; Aktivierung der erworbenen Immunantwort; Rekrutierung von PMN
Interleukin-12	IL-12	Aktivierung der TH1-Immunantwort
Tumornekrosefaktor- α	TNF- α	Chemotaxis; Fieber; Zellproliferation; Phagozytosestimulation
Interferon- α	INF- α	Induktion unspezifischer Entzündungsreaktionen
Interferon- γ	INF- γ	Induktion unspezifischer Entzündungsreaktionen
<i>Antiinflammatorische Zytokine</i>		
Interleukin-10	IL-10	Phagozytoseförderung; Hemmung unspezifischer Entzündungsreaktionen
Transforming Growth Factor- β	TGF- β	Inhibition von TH1-Zellen; Zellproliferation (Wundheilung)
<i>Chemokine</i>		
Interleukin-8	IL-8	Chemotaxis; Stimulation von Adhäsinen
<i>Wachstumsfaktoren</i>		
Granulocyte-colony stimulating factor	G-CSF	Stimulation der Neutrophilenproduktion, -reifung, -aktivierung
<i>Lipidmediatoren</i>		
Prostaglandin E2	PGE2	Fieber
Thromboxan A2	TXA2	Chemotaxis; Thrombozytenaggregation und Vasokonstriktion (Wundheilung)
Leukotrien B4	LTB4	Chemotaxis; Stimulation zur Granulaabgabe

1.4.4 Mechanismen neutrophiler Granulozyten zur Pathogeneliminierung

Neutrophile Granulozyten besitzen vier unterschiedliche Wirkmechanismen um Pathogene mittels chemischer Wirkstoffe zu bekämpfen:

Bei der **Phagozytose** werden feste Partikel (Zellen, Mikroorganismen, Fremdkörper) aktiv ins Zellinnere aufgenommen und anschließend unter Verwendung der Granulainhaltsstoffe intrazellulär abgebaut. Sollte ein Partikel für die Aufnahme zu groß sein („frustrierte oder frustrane Phagozytose“), werden die Wirkstoffe entweder dosiert durch die Verschmelzung einzelner spezifischer Granula mit der Zellmembran (Exozytose) oder massiv durch die Eigenzerstörung der gesamten Zelle in die Umgebung abgegeben. Dieser Mechanismus wird **Degranulation** genannt. Durch Bildung sogenannter **Neutrophil Extracellular Traps (NETs)**, einer faserigen Matrix, die hauptsächlich aus Chromatin und granulären Enzymen besteht, können polymorphkernige Granulozyten Pathogene ebenfalls binden, immobilisieren und abtöten. Durch den **Oxidativen Burst** produziert der neutrophile Granulozyt hoch reaktive Sauerstoffverbindungen, die sowohl in den Granula während der Phagozytose freigesetzt oder direkt in die Umgebung abgegeben werden.

1.4.4.1 Phagozytose

Der Vorgang der aktiven Aufnahme von Pathogenen ins Zellinnere wird Phagozytose genannt und kann, wie in Abb. 3 schematisch dargestellt, in vier Funktionsabschnitte unterteilt werden.

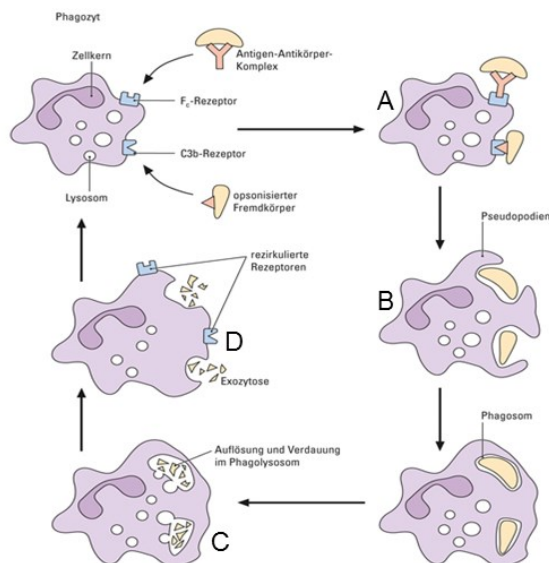


Abb. 3 Schematische Darstellung der Phagozytose [12] - (A) Partikelbindung an der Zellmembran, (B) Invagination und Bildung des Phagosoms, (C) Fusion mit Granula und Bildung des Phagolysosoms, (D) Exozytose und Freigabe der PMN-Rezeptoren

Voraussetzung für die Aufnahme eines Partikels in den Phagozyten ist die Bindung an die Zellmembran (Abb. 3A). In der Literatur sind für neutrophile Granulozyten zwei Wege beschrieben: bei der direkten Bindung werden spezifische, hoch konservierte Baubestandteile der Erreger, sogenannte „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs), durch zelluläre Rezeptoren, den „pathogen recognition receptors“ (PRR), erkannt. Bei der indirekten Erkennung werden die Pathogene mit Hilfe von Opsoninen wie Komplementfaktoren, Antikörpern oder Akute-Phase-Proteine vom Organismus markiert und anschließend durch spezifische Rezeptoren auf der Granulozytenoberfläche gebunden [13; 4]. Bekannte Vertreter der PAMPs sind Mannose, Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien und Peptidoglykane (z.B. Zymosan bei

Hefen), die durch Toll-like-Rezeptoren (TLR) und ggf. CD14 erkannt werden [14]. Für die Bindung von opsonierten Partikeln exprimieren PMN die Fc-Rezeptoren FcγR III (CD16), FcγR I (CD64) und FCαR (CD89) und die Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) [6]. Ist ein zu phagozytierendes Objekt erkannt und fest gebunden, beginnen neutrophile Granulozyten es zu umschließen. Dieser Teilabschnitt der Phagozytose wird Invagination (Abb. 3B) genannt. Durch Umlagerung des Zytoskeletts bilden sich Pseudopodien aus, die anfangs eine Tasche und letztendlich durch Fusion der aufeinandertreffenden Zellmembranen ein geschlossenes Vesikel entstehen lassen. Durch die Abtrennung von der Membran ist das Phagosom entstanden und kann ins Zellinnere wandern, wo es mit den als Lysosomen bezeichneten Granula zum Phagolysosom verschmilzt (Abb. 3C). Die in den Granula enthaltenen Enzyme (bakteriziden Proteine und Peptide) beginnen sofort mit der Abtötung und dem Abbau des phagozytierten Inhalts. Die Abbauprodukte werden mittels Exozytose in die Umgebung abgegeben und die zelleigenen Rezeptoren wieder an die Membran transportiert (Abb. 3D) [13].

1.4.4.2 Degranulation

Kann ein Erreger (Würmer, etc.) auf Grund seiner Größe nicht komplett phagozytiert werden („frustrierte Phagozytose“), springt der Prozess der Degranulation an. Dabei wird der Inhalt lysosomaler Granula nach Fusion der Granula- und der Zellmembran kontrolliert nach außen in die Invaginationstasche abgegeben. Ein geringer Teil der Wirkstoffe gelangt dabei in das umliegende Gewebe, kann aber durch körpereigene Substanzen ausreichend schnell neutralisiert werden, so dass es in der Regel zu keinen Schädigungen kommt. Bei starken proinflammatorischen Reizen kann diese kontrollierte Exozytose in eine unkontrollierte Form übergehen. In diesem Fall zerstören sich die PMN selbständig und der gesamte Enzymbestand wird schlagartig in das Umfeld abgegeben und es kommt folglich zu schweren Gewebeschädigungen [4].

1.4.4.3 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Neben der Degranulation besitzen neutrophile Granulozyten einen zweiten Mechanismus, der es ihnen ermöglicht, Pathogene mittels enzymatischer Wirkstoffe aber ohne vorherige Phagozytose zu zerstören. Hierfür bilden sie nach Aktivierung mit verschiedenen Entzündungsmediatoren (Lipopolysaccharide, Interleukin-8) ein Netzwerk von extrazellulären Fasern, den neutrophil extracellular traps (NETs), aus (Abb. 4) [15].

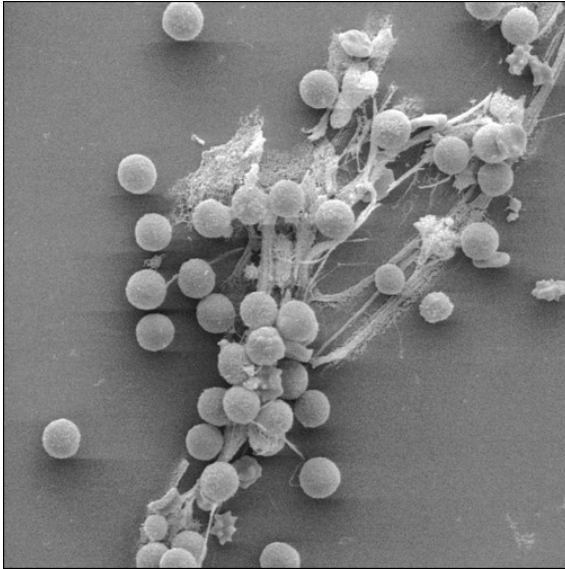


Abb. 4 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) - In Zusammenarbeit mit dem Elektronenmikroskopiezentrum der Universitätsmedizin Rostock

NETs bestehen aus Chromatinsträngen und granulozytären Proteinen und sind zwischen 15 und 25 nm dick [16]. Es wurde mittels Immunfluoreszenz-Analysen nachgewiesen, dass sowohl Eiweiße aus azurophilen Granula wie Elastasen, Cathepsin G und Myeloperoxidase als auch aus sekundären Granula wie Laktoferrin und Gelatinase an die Traps gebunden sind [15]. Ihre antimikrobielle Wirkung entfalten NETs nicht nur gegen grampositive und gramnegative Bakterienarten, sondern auch gegen eukaryotische Erreger wie *Candida albicans*, wo sie sowohl die zellartigen als auch hyphalen Lebensformen binden und vernichten [17]. Ist man lange davon ausgegangen, dass NETs hauptsächlich während gewebeassoziierten Infektionen auftreten, konnte 2007 durch Clark et al. gezeigt werden, dass sie auch bei schwerer Sepsis im Blutstrom vorkommen und dort frei zirkulierende Erreger binden und eliminieren. Die NETose wird dabei durch Thrombozyten angeregt, die über den Toll-like-Rezeptor 4 pathogene Substanzen erkannt haben und dann an neutrophilen Granulozyten binden [16].

1.4.4.4 Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und der Oxidative Burst

Ein weiteres Instrument der bakteriziden Wirkung von neutrophilen Granulozyten ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen („reactive oxygen species“, ROS) mit Hilfe der NADPH-Oxidase. Das Enzym findet man bei polymorphkernigen Neutrophilen sowohl in der Zellmembran als auch in der Membran der Lysosomen. Nach Aktivierung der Granulozyten durch Phagozytose oder Stimulation mit Zytokinen wird die NADPH-Oxidase aus ihren vier Untereinheiten zu ihrer aktiven Form zusammengesetzt. Die Oxidase spaltet von zellulärem NADPH Wasserstoff ab, überträgt dabei ein Elektron auf den molekularen Sauerstoff und bildet so das reaktive Superoxid-Anion O_2^- , welches zusammen mit den Wasserstoffionen entweder in die Lysosomen gepumpt oder in die Umgebung der Zelle abgegeben wird. Bei Anwesenheit von Wasserstoffionen werden die Superoxid-Anionen O_2^- zu Wasserstoffperoxid H_2O_2 umgesetzt. Wasserstoffperoxid H_2O_2 ist eine stabile und reaktionsträge Sauerstoffverbindung, deren Zerfall in hoch reaktive Hydroxyl-Radikale (OH^\bullet) und Hydroxyl-Anionen (OH^-) durch Übergangsmetalle wie Eisen oder Kupfer katalysiert wird. Das Enzym Myeloperoxidase, das in großen Mengen in den primären Granula vorkommt, katalysiert die Oxidation von Halogenen zu deren Säuren, die spontan in ihre hoch

reaktiven Halogen-Anionen zerfallen [4; 18]. Für die Bildung dieser ROS ist die massive Aufnahme von molekularem Sauerstoff in die Zelle bei gleichzeitiger Stoffwechselsteigerung notwendig. Dieser Prozess wird Oxidativer Burst genannt und ist bei den polymorphkernigen Neutrophilen ausschließlich für die ROS-Produktion vorgesehen [19].

1.5 Krankheitsbilder auf Basis defekter Granulozytenfunktion

Da neutrophile Granulozyten eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr von Krankheitserregern einnehmen, ist ihre Funktionalität von äußerster Wichtigkeit um schwere Infektionen des gesamten Organismus zu vermeiden. Defekte, die zu Dysfunktionen oder einem Mangel an neutrophilen Granulozyten, d. h. zu einer Granulozytopenie oder genauer Neutropenie (Zellzahl $<1 \times 10^6/\text{ml}$) führen, können generell in drei Gruppen eingeteilt werden:

Sogenannte **primäre Defekte** sind in polymorphkernigen Neutrophilen direkt verankert und häufig genetisch veranlagt. **Sekundäre Defekte** der Zellen werden durch das sie umgebende Milieu hervorgerufen. Ursachen können dabei Fehlfunktionen von Mediatoren, Einwirkung von exogenen, hemmenden Stoffen wie Toxinen oder Medikamenten oder körpereigene Inhibitoren wie granulozytäre Antikörper sein. Die **dritte Gruppe** umfasst Defekte, die bei Tumoren des blutbildenden Gewebes (Leukämien, etc.) entstehen. In deren Ursache zusammengestellt.

Tab. 4 wurde eine Auswahl von Krankheitsbildern der einzelnen Defektgruppen und deren Ursache zusammengestellt.

Tab. 4 Auswahl von Krankheitsbildern mit Granulozytendysfunktion oder Neutropenie [4; 20; 21]

Erkrankung	Defekt/Symptome	Therapie
<i>Primäre Defekte</i>		
Chronische Juvenile Granulomatose (CGD)	Defekt der NADPH-Oxidase verbunden mit stark verminderter ROS-Produktion, Abszessbildung und Organschädigung	Antibiotikaprophylaxe, operative Sanierung der Abszesse
Chediak-Higashi-Syndrom	Defekt des Zytoskeletts, fehlerhaftes intrazelluläres Arrangement (Bildung von Riesenlysosomen, Mobilitätseinschränkung, mangelnde Chemotaxis)	Antibiotikaprophylaxe, Knochenmarktransplantation
Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD)	Fehlen der Integrine (CD11b,c/CD18), insuffiziente Adhäsion und Emigration der PMN, Neutropenie	Antibiotikaprophylaxe, Knochenmarktransplantation
<i>Sekundäre Defekte</i>		
Defekte der indirekten Erregerbindung	starker Verbrauch von Komplementfaktoren nach Verbrennungen, schweren Traumen, etc. führt zu Opsoninmangel, insuffiziente Phagozytoseaktivierung Agammaglobulinämie (IgG-Mangel)	Antibiotikaprophylaxe Injektion von Gamma-globulinen

Hemmung der PMN-Funktion durch exogene Substanzen	Langzeiteinnahme von Antiphlogistika (Glucocorticoide) Toxine und Wirkstoffe aus der Umwelt (Reinigungsmittel, Insektizide, etc.) durch Überempfindlichkeitsreaktionen	Antibiotikaprophylaxe, Gabe von G-CSF Kontaktvermeidung, Gabe von G-CSF
Autoimmunneutropenie (AIN)	Bildung von granulozytären Autoantikörpern nach Behandlung mit Immunsuppressiva, Infektion Epstein-Barr-Virus	Antibiotikaprophylaxe, Gabe von G-CSF
Entzündliche Überreaktionen (SIRS, Sepsis, MODS, MOF)	anfängliche Hyperinflammation kann von körpereigenen entzündungshemmenden Mechanismen nicht mehr kontrolliert werden und geht in die Immunparalyse mit teilweise oder komplettem Funktionsverlust der PMN über; Entleerung der Knochenmarkreserven	Antibiotikagabe, operative Entfernung des Entzündungsherds, medikamentöse Kreislaufstabilisierung, EISS
<i>Tumorabhängige Defekte</i>		
Chronische myeloische Leukämie	Massiver Erhöhung der PMN-Zahl im Blut ($>5 \times 10^8/\text{ml}$) durch verstärkte Granulopoese, defekter PMN-Stoffwechsel, verminderte Funktionalität	Chemotherapie

Neutropenien führen zu erhöhter Infektanfälligkeit beim Patienten, so dass die angeborene Immunabwehr selbst die physiologische Bakterienflora oder die saprophytischen Pilze des respiratorischen, gastrointestinalen beziehungsweise urogenitalen Bereichs und der Haut nicht mehr kontrollieren kann. Durch Schleimhautläsionen in den genannten Bereichen, aber auch operative Eingriffe jeglicher Art kann eine Sepsis entstehen, bei der sich teilweise kein Infektionsherd oder ein pathogener Erreger feststellen lässt.

1.6 Therapeutische Maßnahmen bei Granulozytopenie

Je nach Ursache der Granulozytopenie ist beispielsweise ein auslösendes Medikament abzusetzen oder eine Autoimmunerkrankung durch geeignete Maßnahmen zu behandeln. Außerdem sollte dem Betroffenen empfohlen werden eine pathogenarme Umgebung aufzusuchen oder geeignete Isolations- und Schutzmaßnahmen (wenig Personenkontakt, Mund-Nasen-Schutz, etc.) zu nutzen. Bei Fieber und nachgewiesenen Keimen im Blut ist eine kalkulierte Antibiose wichtig, kann aber auch bei primären Defekterkrankungen als Prophylaxe in Erwägung gezogen werden [22]. Eine weitere Therapieoption bei anhaltenden Granulozytopenien ist der Einsatz von rekombinant hergestelltem G-CSF („granulocyte colony-stimulating factor“), das zur Beschleunigung der Granulopoese und einem Konzentrationsanstieg von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut führt. So kann G-CSF zur Behandlung und Prophylaxe von neutropenen Zuständen bei Chemotherapie und persistierenden Virusinfektionen (HIV, Epstein-Barr-Virus), aber auch zur Langzeittherapie bei chronischen Neutropenien (kongenitale Neutropenie, idiopathische Neutropenien, etc.) eingesetzt werden [20]. Da die

Wirksamkeit von G-CSF von weiteren Faktoren wie gesunden Ausgangsgewebe, Zytokinen, etc. abhängig ist, kann bei ausbleibendem Erfolg der Therapiemaßnahmen auch die Transfusion von Granulozytenkonzentraten in Erwägung gezogen werden.

1.6.1 Granulozytenkonzentrate (GK)

Die Herstellung von Granulozytenkonzentraten unterliegt in Deutschland den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ [23]. Sie wurden von der Bundesärztekammer unter Zustimmung des Paul-Ehrlich-Instituts erarbeitet und regulieren die Spenderauswahl und -sicherheit, Präparation, Lagerung und Qualitätskontrolle aller Blutprodukte.

Heutzutage werden Granulozytenkonzentrate ausschließlich von gesunden Spendern gewonnen. Die Spender müssen dabei die gleichen Prüfkriterien (Tab. 5) wie für eine Vollblutspende erfüllen. Neben der allgemeinen Gesundheit muss mittels Anamnese ausgeschlossen werden, dass psychiatrische Vorerkrankungen, bekannte Überempfindlichkeitsreaktionen gegen eingesetzte Medikamente oder Erkrankungen wie eine chronische Gastritis, Magen-Darm-Ulzera, Hypertonus oder Diabetes beim Spender vorliegen. Da Granulozytenkonzentrate im Rahmen von gerichteten Spenden hergestellt werden, sollte auf Empfängerkompatibilität bei der Blutgruppe im AB0- und Rh-System geachtet werden. Außerdem sollte bei CMV-negativen Empfängern darauf geachtet werden, dass das Granulozytenkonzentrat ebenfalls CMV-negativ ist, da es in Einzelfällen zu Infektionen und Erkrankungen nach der Granulozytentransfusion beim Patienten kommen kann [24; 25].

Tab. 5 Prüfkriterien der Spendertauglichkeit [23]

Prüfkriterium	Anforderungen
Leukozyten	4,5-11,0 x 10 ⁶ /ml
Erythrozyten	Frauen: 4,1-5,1 x 10 ⁹ /ml Männer: 4,5-5,9 x 10 ⁹ /ml
Thrombozyten	Frauen: 187-406 x 10 ⁶ /ml Männer: 177-360 x 10 ⁶ /ml
MCV	80-96 µm ³
Hämoglobin (Hb) oder Hämatokrit (Hkt) im Spenderblut	Frauen: Hb ≥ 125 g/l (7,75 mmol/l) oder Hkt ≥ 0,38 l/l Männer: Hb ≥ 135 g/l (8,37 mmol/l) oder Hkt ≥ 0,40 l/l
Alter	18–68 Jahre, Zulassung von älteren Spendern oder Erstspendern über 60 Jahre nach individueller ärztlicher Entscheidung möglich
Körpergewicht	mindestens 50 kg
Blutdruck	systolisch: 100-180 mmHg diastolisch: unter 100 mmHg
Puls	unauffällig, Frequenz 50-110/min; Spendewillige, die intensiv Sport betreiben und einen Puls von weniger als 50/min haben, können zugelassen werden
Temperaturmessung	Kein Fieber
Gesamteindruck	keine erkennbaren Krankheitszeichen

Um Granulozytenkonzentrate mit einer therapeutisch wirksamen Dosis an Neutrophilen gewinnen zu können, werden die ausgewählten Spender etwa 8 bis 18 Stunden vor der Spende mit Wachstumsfaktoren (G-CSF) und/oder Kortikosteroiden (Prednisolon, Dexamethason) konditioniert, wodurch es zu einer erhöhten Ausschüttung von Granulozyten aus dem Knochenmark ins periphere Blutsystem kommt [26; 27]. Um diesen Überschuss an Granulozyten im peripheren Blutstrom abzusammeln, wird in den meisten Fällen das Verfahren der kontinuierlichen Apherese angewandt. Dabei wird über eine Venenpunktion Blut entnommen und zusammen mit einem Antikoagulant (Natriumcitrat) in die Separationseinheit überführt. Nach der Abtrennung der Granulozyten werden die restlichen Blutbestandteile über eine zweite Punktionsstelle dem Spender zurückgegeben. Da Granulozyten eine ähnliche Dichte wie Erythrozyten haben, wird zusätzlich ein Sedimentationsbeschleuniger (Hydroxyethylstärke (HES), modifizierte Gelatine, Dextran) zugesetzt, um trotz des geringen Dichteunterschieds eine möglichst gute Auftrennung während der Zentrifugation zu erzielen [28; 29].

Granulozytenkonzentrate sollten nach der Herstellung auf Grund ihres hohen Lymphozytenanteils und um Graft-versus-Host-Reaktionen zu minimieren mit einer mittleren Dosis von 30 Gray bestrahlt werden. Dabei darf ein Grenzwert von 25 Gray an keiner Stelle des Präparats unterschritten werden. Nach der Bestrahlung müssen Granulozytenkonzentrate eine Gesamtzellzahl von mindestens 1×10^{10} Granulozyten pro Apheresat in einem Maximalvolumen von 500 ml aufweisen. Der Hämatokritwert sollte dabei 30% nicht übersteigen. Anschließend sollten sie unverzüglich transfundiert oder bei $22 \pm 2^\circ \text{C}$ maximal 24 Stunden aufbewahrt werden [23].

1.6.2 Granulozytentransfusion

Seit den frühen 1960er Jahren wird die therapeutische Nutzung von Spendergranulozyten zur Behandlung neutropenischer Patienten forciert. So beschrieb die Arbeitsgemeinschaft um E. J. Freireich die Gewinnung und Transfusion von Granulozyten aus Spendern mit einer chronischen myeloischen Leukämie (CML). Auf Grund ihrer Erkrankung hatten diese Patienten eine stark erhöhte Zahl an neutrophilen Granulozyten, so dass Präparate mit einer Zellzahl von $5-13 \times 10^{10}$ hergestellt werden konnten [30; 31]. Für den therapeutischen Erfolg wurde einerseits ein direkter Zusammenhang zum Zeitpunkt der Granulozytentransfusion [32] als auch mit der Anzahl der transfundierten Granulozyten gezogen, so dass die Mindestzellzahl bei Neugeborenen bei $1-2 \times 10^9$ und bei Erwachsenen bei $1-2 \times 10^{10}$ Zellen liegen sollte [33]. Dabei sollte eine Transfusionsgeschwindigkeit von 1×10^{10} Zellen pro Stunde nicht überschritten werden. Obwohl G-CSF stimulierte Granulozytentransfusionen gut verträglich sind [34; 35] und nur mit selten auftretenden Nebenwirkungen (Fieber, Schüttelfrost, CMV-Aktivierung [36], Alloimmunisierung gegen HLA-Merkmale und transfusionsassoziierte Lungenschädigung (TRALI) [37]) verbunden sind, wird die klinische Wirksamkeit immer noch stark diskutiert. So sollte stets eine ausführliche Kosten-/Nutzen-/Risiko-Betrachtung erfolgen. Allgemein sollten zu behandelnde Patienten folgende Kriterien erfüllen: Granulozytopenie $<5 \times 10^5/\text{ml}$, hohes Fieber ($>24-48$ Stunden), positive Bakterien- und/oder Pilzkultur oder Erkrankungszeichen, die trotz optimaler antibiotischer und/oder antimykotischer Behandlung (>48 Stunden) nicht beeinflussbar sind, möglichst früh-

zeitiger Behandlungsbeginn und reelle Gesundungschance [38]. Auch der therapeutische Einsatz bei granulozytären Dysfunktionen im Rahmen von lebensbedrohlichen Infektionen (Sepsis, etc.) ist möglich.

1.6.3 Extracorporeal Immune Support System (EISS)

Das Extracorporeal Immune Support System (EISS) ist eine von der Artcline GmbH Rostock in Kooperation mit der Universitätsmedizin Rostock entwickelte und patentierte Behandlungsmethode für Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock. Bei dieser extrakorporalen Plasmabehandlung werden blutgruppenidentische Spendergranulozyten in therapeutisch wirksamer Dosis in einem Bioreaktor zu Verfügung gestellt. Das durch Plasmaseparation entstandene, mit bakteriellen Bestandteilen und Toxinen kontaminierte Patientenplasma wird über einen zweiten separaten Kreislauf durch den Bioreaktor geleitet. Durch den Kontakt mit dem Plasma werden die Spendergranulozyten aktiviert und ihrer natürlichen Funktion, der Erregereliminierung, nachgehen. Das gereinigte Patientenplasma wird zusammen mit den zellulären Bestandteilen anschließend dem Patienten zurück infundiert. Vorteile dieses Verfahrens sind die Minimierung von möglichen unerwünschten Nebenwirkungen wie der transfusionsassoziierten Lungenschädigung (TRALI), ständige Kontrolle über die Behandlung (sofortige Systemabschaltung), Eliminierung pathogener Substanzen und Immunmodulation ohne Hyperinflammation. Abb. 5 zeigt eine schematische Darstellung des beschriebenen extrakorporalen Immununterstützungssystems EISS.

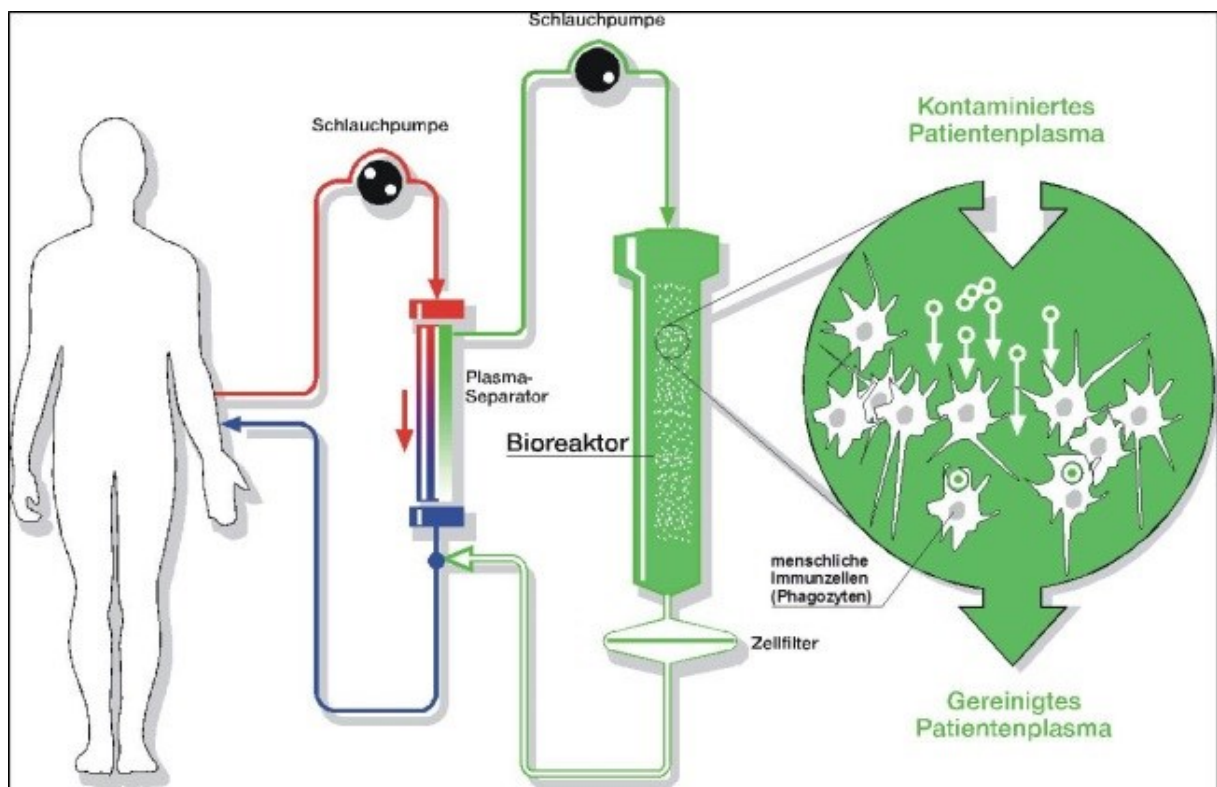


Abb. 5 Schematische Darstellung vom Extracorporeal Immune Support System EISS (freundlichsten zur Verfügung gestellt durch die Firma Artcline GmbH Rostock)

In einer ersten klinischen Phase I-Studie, die zur Untersuchung von Sicherheit, Verträglichkeit und Effektivität von EISS konzipiert war, wurden 10 Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock je zwei Mal über sechs Stunden mit dem System behandelt. Die eingeschlossenen Probanden hatten zum Zeitpunkt der ICU-Einlieferung einen mittleren APACHE II-Score (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) von $29,9 \pm 7,2$ und einen mittleren SAPS (Simplified Acute Physiology Score) von $66,2 \pm 19,5$, die eine Krankenhaus-Mortalitätsrate von 69 % beziehungsweise 72 % erwarten ließen. Während der Studie wurden die Verträglichkeit und technische Sicherheit des Systems, diverse Organfunktionalitäten des Patienten und immunmodulierende Effekt vor und nach der Behandlung aufgezeichnet. Die Beobachtung des Patienten wurde über 28 Tage weitergeführt und die Überlebensrate im Krankenhaus dokumentiert.

Es konnte gezeigt werden, dass das Extracorporeal Immune Support System von den behandelten Patienten gut vertragen wird und ohne Sicherheitsbedenken funktioniert. Während der Behandlung wurde eine signifikante Reduktion der bakteriellen Endotoxinkonzentration festgestellt. Auch die Dosis an Noradrenalin, die für die Stabilisierung des mittleren arteriellen Drucks („mean arterial pressure“, MAP) dem Patienten verabreicht werden musste, konnte über den Beobachtungszeitraum signifikant reduziert werden. Entzündungsmarker wie das C-reaktive Protein, Procalcitonin und das Humane Leukozyten Antigen DR (HLA-DR) zeigten signifikante Verbesserungen nach der Behandlung mit EISS. Die prognostizierte immunmodulatorische Wirkung zeigte sich in einer signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration von Interleukin-1, Interleukin-8, Interleukin-10, Eosin und RANTES. Von den zehn behandelten Patienten verstarben vier an den Beobachtungstagen 6, 9, 18 und 40 im Krankenhaus, sechs der Patienten konnten entlassen werden [39].

Anhand der Resultate der ersten klinischen Studie könnte sich das Extracorporeal Immune Support System perspektivisch als eine effektive und nebenwirkungsarme Alternativbehandlung zur Granulozytentransfusion erweisen.

2 Ziel der Dissertation

Granulozytenkonzentrate als Transfusion oder Zellquelle in extrakorporalen Therapiesystemen sind eine unterstützende und effektive Behandlung bei Patienten mit lebensbedrohlicher Neutropenie oder mit neutrophiler Dysfunktion. Zum momentanen Zeitpunkt sind diese Granulozytenapheresate auf Grund ihrer Herstellung mit einer hohen Zahl an Erythrozyten und Thrombozyten „verunreinigt“. Außerdem sind sie nicht lagerfähig und müssen innerhalb von 24 Stunden klinisch eingesetzt werden. Grund hierfür ist nicht nur die generell kurze Lebensspanne von Granulozyten im Blut (ca. 1 Tag) sondern auch eine schnelle und starke Aktivierung der Granulozyten und Monozyten durch unphysiologische Bedingungen, die zu einem erhöhten Ausstoß von schädigenden Sauerstoffradikalen und Enzymen führen. Da die Herstellung von Granulozytenkonzentraten zusätzlich ziemlich kostenintensiv ist, fällt eine Kosten-Nutzen-Betrachtung eher negativ aus und verhindert den häufigen Einsatz von Granulozytenkonzentraten als Therapeutikum.

Ziel dieser Dissertation war es somit, eine Methode zur Aufreinigung eines Standard-Granulozytenkonzentrates unter Berücksichtigung der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen [22] zu entwickeln. So sollte mit zugelassenen Arzneimitteln und/oder Medizinprodukten die möglichst weitgehende Entfernung von therapeutisch irrelevanten Blutbestandteilen (Erythrozyten, Thrombozyten) erreicht werden. Das resultierende Granulozytenpräparat sollte einen hohen Reinheitsgrad bei gleichbleibend guter oder verbesserter Vitalität und Funktionalität vorweisen. Der gesamte Aufreinigungsprozess musste in einem geschlossenen Blutbeutelsystem von geschultem Fachpersonal in transfusionsmedizinischen Einrichtungen durchführbar sein, da das Präparat in der Humanmedizin zur Behandlung von Patienten angewendet werden soll.

Auf Basis der neu erzielten Reinheit des prozessierten Granulozytenkonzentrates sollte in einem weiteren Untersuchungsschwerpunkt die Lagerung so optimiert werden, dass die Bedingungen für Granulozyten/Monozyten geeignet sind, und so die oben beschriebene Aktivierung minimiert werden kann. Hierfür sollten verschiedene Parameter (Temperatur, Bewegung, Lagerungssystem und -medium, Zellkonzentrationen) getestet und miteinander kombiniert werden, so dass die Haltbarkeit des gereinigten Granulozytenkonzentrates von 24 Stunden bei gleichbleibend guter oder verbesserter Vitalität und Funktionalität maximal verlängert werden kann. Auch hier sollten nur zugelassene Arzneimittel und/oder Medizinprodukte zum Einsatz kommen, um so die Anwendbarkeit in der Humanmedizin garantieren zu können. Außerdem sollten die entwickelten Lagerungsbedingungen am Ende auch in einer transfusionsmedizinischen Einrichtung umsetzbar sein.

Um die Funktionalität und Vitalität während des Entwicklungsprozesses beurteilen zu können, wurden zu ausgewählten Zeitpunkten zell- und molekularbiologische Untersuchungen wie die Messung der Phagozytose- und Oxyburst-Aktivität mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Blutkomponenten und -präparate

3.1.1.1 Granulozytenkonzentrate

Die für diese Dissertation verwendeten Granulozytenkonzentrate wurden durch das Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von Prof. Dr. med. Volker Kiefel nach deren SOP Nr. II.2.7.5.1. (Version-Nr. 2) basierend auf den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) im einem Zeitraum von Juni 2010 bis Juni 2014 hergestellt.

Um die Ausschüttung von Granulozyten aus dem Knochenmark und deren Zirkulation im peripheren Blutsystem zu verstärken bzw. zu verbessern, wurden geeignete Spender 12-16 Stunden vor der Apherese mit 1,5 µg/kg Körpergewicht Granocyte® (Lenogastim) s. c. und 8 mg Dexamethason oral stimuliert. Die Granulozytapherese wurde mit dem Apherese-System COBE® spectra, Programm zur Gewinnung von PMN (Softwareversion 7.1) von Terumo BCT im Durchflussmodus durchgeführt. Die Granulozytenkonzentrate sollten nach Fertigstellung eine Granulozytenmindestzellzahl von 1×10^{10} pro Einheit in einem Volumen von <500 ml enthalten. Der Hämatokritwert sollte nicht über 30% liegen [23].

3.1.1.2 Gefrorenes Frischplasma (GFP aus Vollblut)

Gefrorene Frischplasmen entstehen neben den Erythrozytenkonzentraten bei der zentrifugalen Aufbereitung von Vollblutspenden. Das Vollblut wird während der Spende mit 70 ml CPD-Stabilisator versetzt. Diese Lösung enthält neben 26,3 g Natriumcitrat als Antikoagulans zusätzlich noch 3,27 g Citronensäuremonohydrat, 25,5 g Glucosemonohydrat und 2,51 g Natriumdihydrogenphosphatdihydrat auf 1000 ml Wasser für Injektionszwecke [35]. Nach einer hochtourigen Zentrifugation ($2960 \times g$ ohne Bremse, 10 min, 22 °C) werden das Erythrozytenkonzentrat nach unten und das CPD-haltige Plasma nach oben mittels automatischen Blutkomponenten-Extraktor abgepresst. Das so gewonnene zellarme Frischplasma darf lediglich $<0,1 \times 10^9/l$ Leukozyten, $<6 \times 10^9/l$ Erythrozyten und $<50 \times 10^9/l$ Thrombozyten enthalten [23]. Mit geeigneten Gefrierautomaten wird es anschließend innerhalb von 30 min auf unter -23 °C tiefgefroren [40] und kann anschließend bei -30 bis -40 °C (± 3 °C) über 1 Jahr gelagert werden [23]. Für die in dieser Dissertation beschriebenen Versuche wurden jeweils 3 bis 4 Plasmen einer Blutgruppe bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, unter sterilen Bedingungen gepoolt und bis zur Verwendung (Resuspension der gereinigten Granulozyten) bei Raumtemperatur gelagert. Das dabei verwendete GFP unterschiedlicher Blutgruppen wurde durch das Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2 Labormaterialien, Chemikalien und Reagenzien

Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Labormaterialien, Chemikalien und Reagenzien ist im Anhang dieser Dissertation zu finden.

3.3 Standard-Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Granulozytenqualität

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Experimente wurden sowohl während der Entwicklung der Aufreinigungsmethode als auch bei der Testung verschiedener Lagerungsparameter durchgeführt und zur Beurteilung des physiologischen Zustandes der Granulozyten herangezogen. Hierfür wurden sowohl vor als auch nach der Aufreinigung eines Granulozytenkonzentrates und jeweils zu Lagerungsbeginn und nach 24, 48 und 72 Stunden nach gründlicher Resuspension der Leukozyten mit Hilfe eines Monovetten-Adapters und der passenden Lithium-Heparin-Monovette Probenmaterial über das Schlauchsegment des Blut- bzw. Lagerungsbeutels unter sterilen Bedingungen entnommen. Der Schlauch wurde im Anschluss wieder steril verschweißt.

Die in den Abschnitt 3.4 erläuterten Methoden wurden zusätzlich an entscheidenden Entwicklungspunkten zur morphologischen Beurteilung der Granulozyten durchgeführt.

Abb. 6 veranschaulicht, welches Probenmaterial für die Untersuchungsmethoden beider Abschnitte verwendet wurde.

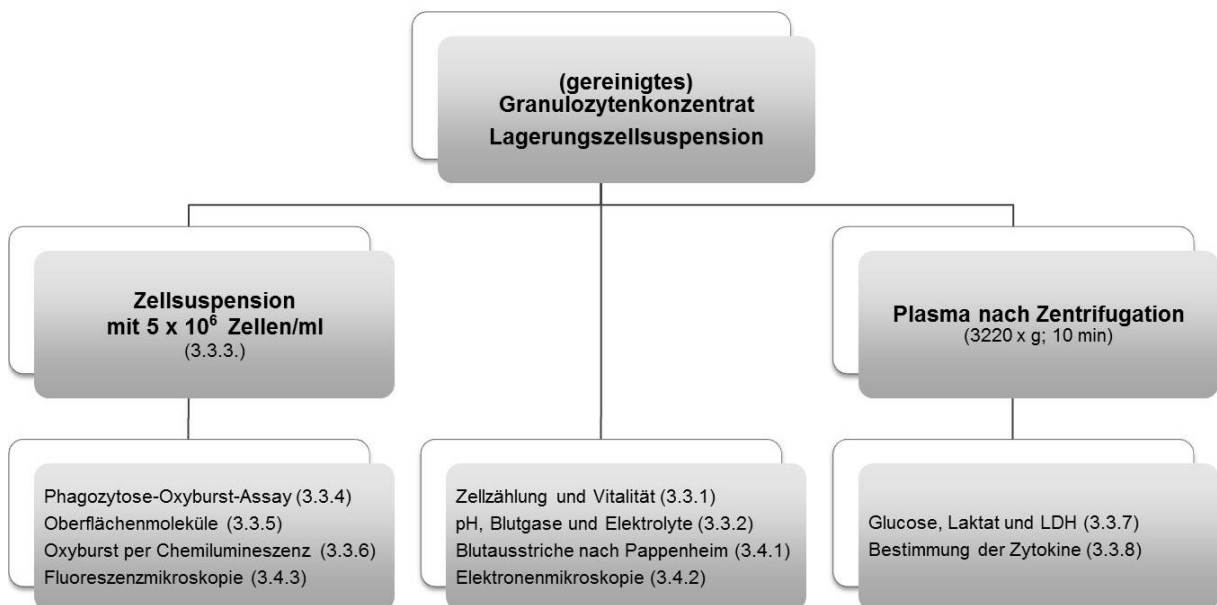


Abb. 6 Übersicht des verwendeten Probenmaterials für die angewandten Untersuchungsmethoden GK, gereinigtes GK und Lagerungszellsuspension wurden nach der Abnahme entweder pur verwendet (mittlerer Pfad) oder zu einer definierten Zellsuspension (linker Pfad) bzw. zu Plasma (rechter Pfad) weiter prozessiert

3.3.1 Automatisierte Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Für die Bestimmung der Konzentrationen der zellulären Blutbestandteile (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) und die Differenzierung der Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten wurde das automatische Hämatologie-Analysesystem KX-21N der Firma Sysmex verwendet, welches nach dem elektrischen Widerstandsmessprinzip arbeitet. Dabei wird eine definierte Menge der Blut- bzw. Leukozytensuspensionsprobe durch das Analysesystem angesaugt und mit einer leitfähigen Flüssigkeit verdünnt. Nach der Suspension werden die Blutzellen durch eine Kapillare, an die ein elektrischer Strom angelegt ist, geleitet. Da sich der elektrische Widerstand der Blutzellen untereinander und von dem der Verdünnungsflüssigkeit unterscheidet, werden Spannungsveränderungen, die proportional zur Größe der durchgeschleusten Zelle sind, gezählt, verarbeitet und im Display bzw. als Ausdruck ausgegeben.

Für die Bestimmung der Vitalität der Leukozyten und dem Abgleich der Leukozytenkonzentration wurde der Countess® Automated Cell Counter von Life Technologies GmbH eingesetzt. Für die vorab durchgeführte Erythrozytenlyse wird 1 Teil Zellsuspension mit 9 Teilen Ammoniumchlorid-Puffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM, pH 7,35 - 7,45) gemischt und anschließend 8 min bei Raumtemperatur unbewegt inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird wiederum 1 Teil des Lyseansatzes mit 9 Teilen PBS verdünnt. Die entstandene PBS-Zellsuspension wird zu gleichen Teilen mit Trypanblau 0,4% gemischt und in die zugehörigen Zählkammern pipettiert. Der Zellzähler ermittelt und berechnet nach einem eigenen Algorithmus innerhalb von 30 Sekunden die Zellkonzentration und Vitalität der Leukozyten nach der Standard-Trypanblau-Färbung, bei der zwischen lebenden (hell, nicht angefärbt) und toten (dunkelblau angefärbt) Zellen optisch unterschieden wird.

3.3.2 Bestimmung des pH-Werts, der Elektrolyte und der Partialdrücke für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid

Für die Bestimmung des pH-Werts, der Natrium-, Kalium- und Chloridkonzentration und der Partialdrücke wurden dieselben Proben der Zellsuspension verwendet, die bereits für die automatisierte Zellzählung und Vitalitätsbestimmung entnommen wurden. Diese wurden innerhalb von 15 Minuten nach Abnahme mit dem Blutgasanalysator ABL 77 von Radiometer gemessen.

Über eine Einlasskapillare wird ein kleines Volumen der zu untersuchenden Flüssigkeit in eine Durchflusszelle in der Sensorkassette gesaugt. Innerhalb dieser Durchflusszelle befinden sich die Parameter-Messsensoren und die Referenzelektrode für den potentiometrischen Sensor. Die Konzentrationen der Parameter werden dabei nach dem elektroanalytischen Verfahren der Potentiometrie, das sich die Konzentrationsabhängigkeit des elektrochemischen Potentials zu Nutze macht, quantifiziert. Dabei wird das elektrochemische Potential mit speziellen Elektroden für die einzelnen Parameter in der angesaugten Zellsuspension gemessen und anschließend mit einer Kalibrationsgeraden angeglichen. Diese Kalibrationsgerade wird durch den ABL 77 und den

im Kalibrationspack enthaltenen Lösungen vollautomatisch erstellt. Da der Blutgasanalysator ABL 77 das Probenmaterial systemseitig stets auf 37 °C erwärmt (Körpertemperatur eines Menschen), wurde die „Patienten“-temperatur so manuell am Gerät korrigiert, dass sie mit der Lagerungstemperatur der Zellsuspension übereinstimmt.

3.3.3 Probenvorbereitung für den kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay, die Bestimmung der Oxyburst-Aktivität mittels Chemilumineszenz und der Expression der Oberflächenmarker

Aus jeder Probe vom (gereinigten) Granulozytenkonzentrat und den Lagerungsansätzen, die mittels Heparin-Monovette und Kanüle aus den Blut- bzw. Lagerungsbeuteln abgenommenen wurden, wurden 2×10^7 Leukozyten entnommen und in 4 ml blutgruppenidentischem, gepooltem CPD-Frischplasma aufgenommen. Die entstandene Leukozytensuspension hatte somit eine Endkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml. Sie wurde für die Methoden 3.3.6 bis 3.3.6 und 3.4.3 verwendet.

3.3.4 Kombiniertes Phagozytose-Oxyburst-Assay

Bei dem hier durchgeführten Assay handelt es sich um eine laborintern entwickelte und etablierte Methode, bei dem mittels Durchflusszytometrie, auch FACS-Analyse genannt, die Phagozytose- und Oxyburstaktivität der Granulozyten und Monozyten untersucht wurde.

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren bei dem simultan mehrere optische Parameter der Leukozyten analysiert werden. Hierfür werden die suspendierten Einzelzellen in einer Trägerflüssigkeit durch einen Lichtstrahl (Laser) mit einer Wellenlänge von 488 nm geführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und den damit verbundenen Eigenschaften charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden können.

Als Grundlage des kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assays wurde das Analysekit Phagotest® der Firma Glycotope Biotechnology GmbH. Für die Oxyburst-Testansätze wurden neben den Reagenzien aus dem Phagotest®-Kit zusätzlich die opsonisierten *E.coli* (Reagenz B) aus dem Phagoburst®-Kit (Glycotope Biotechnology GmbH) genutzt. Für die Durchführung wurden alle Reagenzien laut Anleitung vorbereitet. Zusätzlich wurde eine 0,4%ige EDTA-PBS-Lösung zum Abstoppen der Phagozytose nach der Inkubation hergestellt. Als Nachweis für die Phagozytose-Leistung dienen die mit FITC (Fluorescein Isothiocyanat) markierten *E.coli*. Für den Nachweis der Oxyburst-Leistung wurde neben den opsonisierten *E.coli* zusätzlich eine 10 mM Dihydrorhodamin (DHR)-Lösung benötigt, die vor Gebrauch durch 1:10-Verdünnung mit PBS aus der Stammlösung hergestellt werden musste. Das DHR diffundiert in die Zellen und wird dort von freien Sauerstoffradikale (O_2^- , H_2O_2) zum fluoreszierenden Rhodamin oxidiert.

Die Durchführung des kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay basiert auf fünf 15 ml-Zentrifugenröhrchen und läuft nach dem unten aufgeführten Schema (Tab. 6) ab.

- Röhrchen 1 (Zellen ohne *E.coli*) - Negativkontrolle; Ausschluss der Eigenfluoreszenz
- Röhrchen 2 (Zellen mit FITC-*E.coli* auf Eis) - Negativkontrolle Phagozytose
- Röhrchen 3 (Zellen mit FITC-*E.coli*) - Positivkontrolle Phagozytose
- Röhrchen 4 (Zellen mit DHR ohne *E.coli*) - Negativkontrolle Oxyburst
- Röhrchen 5 (Zellen mit DHR & *E.coli*) - Positivkontrolle Oxyburst

Tab. 6 Pipettierschema des kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assays

Röhrchen 1	Röhrchen 2	Röhrchen 3	Röhrchen 4	Röhrchen 5
100 µl Leukozytensuspension (3.3.3)				
20 µl PBS; vortexen			20 µl PBS; vortexen	
			5 µl DHR; vortexen	
Inkubation 5 min, RT, dunkel	Inkubation 5 min auf EIS, dunkel	Inkubation 5 min, RT, dunkel		
	20 µl eiskalte FITC- <i>E.coli</i> ; vortexen			20 µl eiskalte <i>E.coli</i> ; vortexen
Inkubation 20 min, 37°C, nach 10 min vortexen	Inkubation 20 min, auf EIS, n. 10 min vortexen	Inkubation 20 min, 37°C, nach 10 min vortexen		
100 µl eiskalte Quenching-Lösung				
2x Waschen: 2 ml eiskalte 0,4%ige EDTA-PBS-Lösung – vortexen – zentrifugieren: 4°C, 5 min, 300 x g – Überstand absaugen				
Erythrozytenlyse: 1 ml Lyse (1x) – vortexen – Inkubation 10 min, RT, dunkel (GK: 2 ml Lyse (1x) - Inkubation 20 min)				
Zentrifugation: 5 min, 300 x g, 4°C – Überstand absaugen				
2 ml Waschlösung – vortexen – Zentrifugation: 5 min, 300 x g, 4°C – Überstand absaugen				
200 µl DNA Färbelösung – vortexen – Inkubation 10 min auf EIS, dunkel				
200 µl PBS				
Messung am FACS Calibur				

Sowohl die Messung der Reaktionsansätze als auch die Auswertung der Messergebnisse wurde am FACS Calibur mit der Software CellQuest™ Pro von BD Biosciences durchgeführt. Für die Auswertung der Phagozytose-Messergebnisse wurden die Daten für Röhrchen 1, 2 und 3 einer Probe (Beispiel: GK) in eine selbstentwickelte Vorlage (Abb. 7) eingeladen. Die Auswertung für den Oxyburst erfolgt identisch zu der der Phagozytose, jedoch mit den Messergebnissen von Röhrchen 1, 4 und 5.

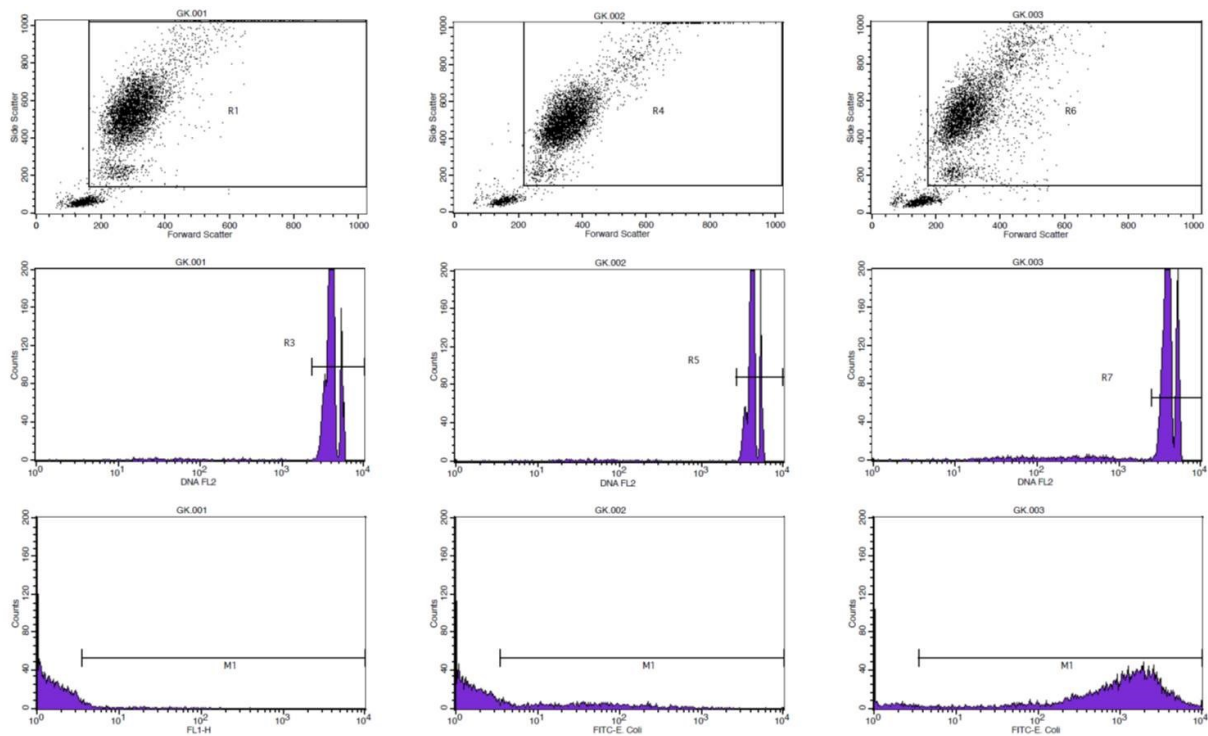


Abb. 7 Auswertungsvorlage für den kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay am Beispiel der Phagozytose-Messergebnisse (Röhrchen 1 bis 3). Obere Reihe: Leukozyten im Forward und Side Scatter nach Größe und Granularität aufgetragen; R1, R4, R6 begrenzen Granulozyten und Monozyten. Mittlere Reihe: R1, R4, R6 in Abhängigkeit zur Vitalität (DNA-Färbung) dargestellt und durch R3, R5, R7 (vitale Zellen) eingegrenzt. Untere Reihe: Darstellung der vitalen Zellen in Abhängigkeit zur Fluoreszenz; Marker (M1) umfasst 2 bis 3% der Leerwert-Ereignisse (Eigenfluoreszenz der Zellen) und wird in die weiteren Histogramme übertragen. Histogrammstatistik: „M1“ und „%Gated“ entspricht dem Anteil phagozytierender Granulozyten/Monozyten; „M1“ und „Mean“ entspricht der mittleren Fluoreszenzintensität (Index für die Menge der phagozytierten *E.coli* pro Zelle).

3.3.5 Bestimmung der Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD35, CD64 und CD89

Um die Expressionsrate der aufgeführten Oberflächenmoleküle auf den Granulozyten und Monozyten zu bestimmen, wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC, PE) markierte Antikörper, die gegen den entsprechenden CD-Marker gerichtet sind, und deren entsprechende Isotypen-Kontroll-Antikörper von BD Biosciences verwendet. Zu je 100 µl der vorbereiteten Leukozytensuspension (3.3.3) wurden je 10 µl eines CD-Marker- oder eines Isotypen-Kontroll-Antikörpers in ein Rundbodenröhrchen pipettiert. Die Testansätze wurden vorsichtig gevortext und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden je 900 µl der 1x FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences) zugegeben, die Testansätze vorsichtig gevortext und nochmals für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubiert. Nach dem Lyseschritt wurden die Testansätze am FACS Calibur mit der Software CellQuest™ Pro gemessen und ausgewertet. Für die Auswertung der Messergebnisse wurde eine eigene Vorlage (Abb. 8) entwickelt.

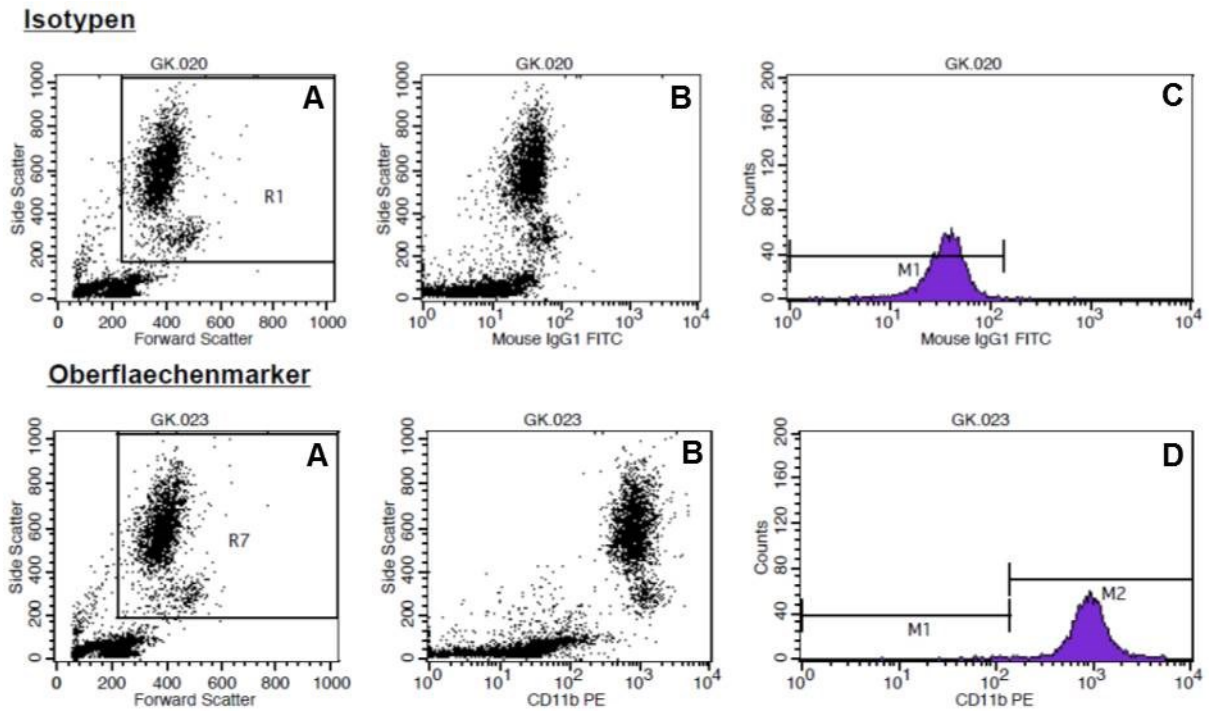


Abb. 8 Auswertungsvorlage für die Bestimmung der Expression von Oberflächenmolekülen am Beispiel von CD11b (A) Leukozyten im Forward und Side Scatter nach Größe und Granularität aufgetragen; R1 und R7 begrenzen die Granulozyten und Monozyten. (B) Fluoreszenz der in R1 und R7 eingeschlossenen Leukozyten in Abhängigkeit zur Granularität. (C) Marker (M1) erfasste den kompletten Peak (min. 98%) und ergibt damit die Fluoreszenz der unspezifischen Antikörperbindungen. D M1 wird kopiert und ins Ergebnishistogramme der Oberflächenmoleküle übertragen; Zweiter Marker (M2), der die Fluoreszenz der spezifischen Antikörperbindungen umfasst, wird direkt an M1 anschließend eingesetzt und umfasst den kompletten Peak. Histogrammstatistik: „M2“ und „%Gated“ entspricht dem Anteil der exprimierenden Granulozyten/Monozyten; „M2“ und „Mean“ die mittlere Fluoreszenzintensität (Index für die Anzahl des exprimierten Moleküls pro Zelle)

3.3.6 Bestimmung der Oxyburst-Aktivität mittels Chemilumineszenz

Neben dem kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay wurde die Aktivität des oxidativen Bursts der Granulozyten während der Lagerung auch noch mittels Chemilumineszenz-Messung bestimmt. Bei dieser Bestimmungsmethode werden Luminophore (N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridiniumdinitrat (Lucigenin) und Luminol) eingesetzt, die durch die chemische Reaktion mit dem beim Oxyburst freigesetzten Wasserstoffperoxid in einen angeregten Zustand übergehen und beim Rückgang in den Grundzustand messbares Licht emittieren. Zum Anregen der Granulozyten wurde Zymosan A, ein Zellwandbestandteil von Hefen, verwendet. Vor den Messungen wurden die beiden Arbeitslösungen frisch hergestellt. Hierfür wurde die Lucigenin-Stammlösung (6,5 mM in 0,9%iger NaCl) 1:10 und die Luminol-Stammlösung (100 mM in DMSO) 1:100 mit PBS verdünnt und dunkel bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Messung jeder Probe erfolgte im Dreifachansatz und wurde nach dem in Abb. 9 dargestellten Pipettierschema aufgetragen. Dabei wurde als erstes die vorbereitete Leukozytensuspension (3.3.3) auf eine weiße 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert, gefolgt von den Luminophoren und dem PBS für den Nullwert bzw. die Vorstimulation der Granulozyten. Das Zymosan wurde erst kurz vor Messstart hinzugegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100µl Zellen 50µl Lucigenin 50µl PBS											
B	100µl Zellen 50µl Lucigenin 50µl Zymosan											
C	100µl Zellen 50µl Luminol 50µl PBS											
D	100µl Zellen 50µl Luminol 50µl Zymosan											

Abb. 9 Pipettierschema für die Messung der Oxyburst-Aktivität mittels Chemilumineszenz

Die Messung wurde mit folgenden Programmeinstellungen am Luminoskan Ascent RS durchgeführt:

- Startup-Temperatur: 37 °C
- Inkubationstemperatur: 37 °C
- Messreihenfolge: entsprechend der Zymosan-Zugabe
- Messvariante: Kinetik
- Empfindlichkeit: hoch
- Integrationszeit: 1 s
- Messintervall: 2 min
- Anzahl Messungen: 30

Für die Auswertung der Daten wurden die Mittelwerte aus den Resultaten der Dreifachansätze errechnet und die Messwerte der PBS-Ansätze von den Messwerten mit Zymosan subtrahiert.

3.3.7 Bestimmung der Glucose-, Laktat- und Laktatdehydrogenasekonzentration

Für die Bestimmung der Glucose-, Laktat- und Laktatdehydrogenasekonzentration wurde das Analysesystem Cobas® Mira Plus von Roche Deutschland GmbH verwendet. Dieser voll automatische und programmierbare Analyzer arbeitet nach dem photometrischen Messverfahren und quantifiziert mit Hilfe von kommerziellen Reagenzienkits verschiedenste Substratkonzentrationen der klinischen Chemie in-vitro aus geeignetem Probenmaterial. Als Probenmaterial für alle 3 Testansätze wurde in dieser Forschungsarbeit Lithium-Heparin-Plasma verwendet, das durch Zentrifugation (3220 x g, 10 min, 4 °C) der abgenommenen Zellsuspensionsproben hergestellt wurde, verwendet.

Für die Messung der Glucose- bzw. Laktatkonzentration wurden die Reagenzienkits Glucose GOD-PAP und Laktat LOX-PAP von LT-SYS Diagnostika GmbH verwendet. Bei diesem Testverfahren werden die im Probenmaterial enthaltenen Substrate durch die entsprechende Oxidase unter Freisetzung von Wasserstoffperoxid umgesetzt. Dieses reagiert mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zu dem Farbstoff Chinonimin. Die Intensität des Farbstoffs ist proportional zur Konzentration und wird bei einer Wellenlänge von 546 nm photometrisch

gemessen. Die Reagenzien sind gebrauchsfertig und wurden nach der Anleitung verwendet. Da der Laktattest jedoch nur bis zu einer Konzentration von 22,2 mmol/l linear verläuft, wurden die Proben bei entsprechenden Resultaten 1:2 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt, ein weiteres Mal gemessen und die Ergebnisse anschließend mit dem Faktor 2 multipliziert.

Mit dem LDH (IFCC)-Kit, ebenfalls von LT-SYS Diagnostika GmbH, wurde die Laktatdehydrogenase-Konzentration in den Plasmen quantifiziert. Vor Gebrauch mussten 4 Teile Reagenz R1 und 1 Teil Reagenz R2 gemischt werden. Das im Reagenziengemisch enthaltene Laktat wird durch die Laktatdehydrogenase zu Pyruvat umgesetzt. Die sich verändernde Extinktion wird bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

3.3.8 Bestimmung ausgewählter Zytokine

Für die Bestimmung der ausgewählten Zytokine wurde die Methode des Sandwich-ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) genutzt. Bei diesem Detektionsverfahren werden Multiwell-Mikrotiterplatten, die mit einem auf das zu bestimmende, lösliche Substrat passenden Primärantikörper beschichtet sind, genutzt. Das gebundene Zytokin wird anschließend mit einem enzymmarkierten Sekundärantikörper detektiert. Durch die Zugabe eines kolorimetrischen Substrats, das durch das Enzym umgesetzt wird, kommt es zu einem Farbumschlag, der mit einem Photometer gemessen wird. Durch den parallelen Einsatz eines Konzentrationsstandards kann anhand der entstehenden Standardkurve die Zytokinkonzentration im Probenmaterial errechnet werden.

In dieser Dissertation wurden die ready-to-use LEGEND MAX™ ELISA-Kits für humanes Probenmaterial von BioLegend Europe verwendet. Als Probenmaterial wurde Lithium-Heparin-Plasma verwendet, das durch Zentrifugation (3220 x g, 10 min, 4 °C) der abgenommenen Zellsuspensionsproben hergestellt wurde. Die ELISAs wurden entsprechend der Prozessbeschreibung abgearbeitet und mit dem Photometer Anthos Reader 2010 von Biochrome Ltd. gemessen.

3.4 Mikroskopische Methoden zur Beurteilung der Granulozytenmorphologie

3.4.1 Herstellung von Blutausstrichen und Färbung nach Pappenheim

Von den entnommenen Zellsuspensionsproben wurden nach konventioneller Technik [3] Blutausstriche angefertigt, luftgetrocknet und innerhalb von 5 Tagen nach Pappenheim gefärbt.

Für die Färbung nach Pappenheim wurden je 75 ml Methanol, May-Grünwald-Lösung, Aqua dest. und eine 1:15 mit Aqua dest. verdünnte Giemsa-Lösung in Färbegläser gefüllt. Die luftgetrockneten Blutausstriche wurden als erstes für 10 min in Methanol fixiert. Nach der Fixierung wurden sie in das Färbegefäß mit der May-Grünwald-Lösung überführt, 4 min inkubiert und anschließend in Aqua dest. ausgiebig gespült. Die Objektträger wurden nun 20 min in der Giemsa-Arbeitslösung inkubiert, anschließend zwei Mal mit Aqua dest. gespült und dann schrägstehend luftgetrocknet. Die gefärbten Blutausstriche wurden unter dem Lichtmikroskop DM IL LED analysiert.

3.4.2 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Um die Morphologie der aufgereinigten und gelagerten Granulozyten besser beurteilen zu können, wurde zu ausgewählten Zeitpunkten von den Granulozyten Aufnahmen sowohl mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) als auch mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) gemacht. Die Elektronenmikroskopie ermöglicht dabei die hochauflösende Abbildung von Objektoberflächen (REM) oder -strukturen (TEM) im Nanometerbereich.

Für die Fixierung der Granulozyten wurden je 50 µl des entnommenen Zellmaterials in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, zentrifugiert (300 x g, 5 min) und der Überstand anschließend verworfen. Die Zellpellets wurden in 450 µl Fixativ (vorab auf Raumtemperatur erwärmt) resuspendiert. Die Fixierungsansätze inkubierten über Nacht bei Raumtemperatur, bevor sie anschließend bis zu 4 Wochen im Kühlschrank (4 °C) gelagert werden konnten.

Voraussetzung für die Rasterelektronenmikroskopie von wasserhaltigen Proben ist eine Trocknung. Dies kann durch die sogenannte Kritische-Punkt-Trocknung erfolgen, bei der das in der Probe enthaltene Wasser durch ein organisches Lösungsmittel, das mit flüssigem Kohlendioxid unter Druck vermischt wurde, ersetzt wird. Durch weitere Druckerhöhung wird das Kohlendioxid dann wieder gasförmig („Kritische Punkt“) und verflüchtigt sich aus dem Probenmaterial. Um innere Strukturen einer Probe mittels Transmissionselektronenmikroskopie untersuchen zu können, müssen nach geeigneter Stabilisierung des Materials (Einbetten in flüssigen Kunststoff mit anschließender Aushärtung) Ultradünnschnitte (60-80 nm dick) mit Ultramikrotomen hergestellt werden. Beide Probenprozessierungen wurden freundlicherweise durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Elektronenmikroskopischen Zentrums (EMZ) der Universitätsmedizin Rostock unter der Leitung von PD. Dr. sc. nat. Marcus Frank durchgeführt. Am Tag der Weiterverarbeitung wurden die fixierten Leukozyten zentrifugiert (300 x g, 5 min) und anschließend mit 0,05 M HEPES-Puffer zwei Mal gewaschen. Die gewaschenen Pellets wurden dem EMZ übergeben.

Die eigenständige Analyse der entsprechenden Proben und Ultradünnschnitte erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop DSM 960A bzw. dem Transmissionselektronenmikroskop Libra 120 der Firma Carl Zeiss, Oberkochen.

3.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Um die Phagozytoseaktivität der Granulozyten auch bildlich nachweisen zu können, wurden fluoreszenz-mikroskopische Präparate von den Zellen hergestellt und am Fluoreszenzmikroskop Eclipse Ti von Nikon ausgewertet. Dabei wurde Phalloidin-TRITC zur Markierung des Actins und somit des Zellkörpers, DAPI für den Zellkern und FITC-markierte *E.coli* für den Nachweis aufgenommener Partikel in die Zelle als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Die für die Methode benötigte Arbeitslösung von Phalloidin-TRITC (Stammlösung 0,1 mg/ml in PBS) wurde vorab frisch 1:20 mit PBS verdünnt. Außerdem wurde aus der 10x FACS™ Lysing Solution (BD Biosciences) eine 1x Arbeitslösung durch 1:10-Verdünnung mit Aqua dest.

hergestellt. Alle anderen benötigten Reagenzien waren gebrauchsfertig und konnten sofort verwendet werden.

Für die Phagozytosereaktion wurden 20 µl FITC-*E.coli* (PHAGOTEST® Reagenz B) zu 100 µl der vorbereiteten Leukozytensuspension (3.3.3) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, gevortext und im Wasserbad bei 37 °C für 10 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden im Anschluss 100 µl PBS zu den Inkubationsansätzen gegeben und vorsichtig gevortext. Für die Lyse der restlichen Erythrozyten und zur Fixierung der Zellen werden die Leukozyten vorab zentrifugiert (300 x g; 5 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl 1x FACS™ Lysing Solution resuspendiert und für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden im Anschluss nochmals zentrifugiert (300 x g, 5 min) und der Überstand verworfen. Die im Pellet befindlichen Leukozyten wurden nun in 50 µl der Phalloidin-TRITC-Verdünnung aufgenommen und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25 °C) erneut inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch einen Waschschriff mit 50 µl Aqua dest., anschließender Zentrifugation (300 x g, 5 min) und Verwerfen des Überstands aus den Reaktionsansätzen entfernt. Das Pellet mit den fluoreszenzgefärbten Leukozyten wurde in 10 µl Aqua dest. aufgenommen. 5 µl der Zellsuspension wurden auf einem Objektträger vorsichtig ausgestrichen, luftgetrocknet und mit dem DAPI-haltigem IS Mounting Medium (dianova) und einem Deckgläschen verschlossen. Die so präparierten Objektträger wurden bis zur kompletten Trocknung des Eindeckelmediums liegend im Dunkeln gelagert und anschließend analysiert.

3.5 Entwicklung des Aufreinigungsprozesses von Granulozytenkonzentrat

3.5.1 Stufe I - Downscaling Versuche

Basierend auf den arbeitsgruppeninternen Forschungsergebnissen und der Dissertation von Dr. med. Antje Lübcke [41] zur Herstellung einer Leukozytenpräparation aus gepoolten Buffy Coats sollten in Stufe I der Methodenentwicklung zur Herstellung einer Leukozytenpräparation aus Granulozytenkonzentraten verschiedene Parameter (Sedimentation vs. Zentrifugation, Volumenverhältnis zwischen Hydroxyethylstärke (HES) und Granulozytenkonzentrat, HES mit unterschiedlichen Molekülmassen) in volumenminimierten Versuchen (downscaling) untersucht werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse, die experimentell aufeinander aufbauen, sollten der effektiven Entfernung der Erythrozyten aus dem Granulozytenkonzentrat dienen. Durch anschließende Waschschriffe mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) sollte ein Großteil der enthaltenen Thrombozyten entfernt werden.

3.5.1.1 Sedimentation vs. Zentrifugation

Da aus vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe mit Buffy Coats bekannt war, dass die Sedimentationszeit meist zwischen 35 und 45 Minuten dauerte bis eine klare Trennlinie zwischen dem Erythrozytenpellet und dem hellen leukozytenhaltigen Überstand entstand, sollte durch die im Folgenden beschriebenen Versuche geklärt werden, ob durch Zentrifugation die Trennung von Leukozyten und Erythrozyten nach Zugabe von Hydroxyethylstärke (HES) beschleunigt werden

kann. Dabei wurde ausschließlich Infukoll® HES 6 % (Mw 200.000) der Serumwerke Bernburg AG verwendet, da dieses zugelassene Arzneimittel auch bei der Herstellung der Standard-Granulozytenkonzentrate in der Transfusionsmedizin als Sedimentationsbeschleuniger eingesetzt wird.

Für die Experimente wurden 15 ml Granulozytenkonzentrat mit 15 ml der HES 200-Lösung (GK-HES-Verhältnis 1:1) in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorsichtig gemischt und anschließend bei 4°C und 300 x g in einer Tischzentrifuge für 5 min zentrifugiert. Die dünne Leukozytenschicht auf dem Erythrozytenpellet wurde vorsichtig abpipettiert und in physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) überführt und resuspendiert. Die Leukozyten-Kochsalz-Lösung wurde abermals zentrifugiert (300 x g, 4°C, 5 min) und der thrombozytenhaltige Überstand abgenommen und verworfen. Der Waschschrift mit 0,9 %iger NaCl-Lösung wurde wiederholt. Anschließend wurde das Leukozytenpellet in 15 ml blutgruppenidentischem CPD-Plasma resuspendiert.

3.5.1.2 Verhältnis zwischen Granulozytenkonzentrat und Hydroxyethylstärke

Für die Versuche zur Überprüfung des optimalen HES-Granulozytenkonzentrat-Volumenverhältnis wurden jeweils 10 ml Granulozytenkonzentrat in 20 ml- bzw. 30 ml-Spritzen aufgenommen. Anschließend wurden, wie in Tab. 7 aufgeführt, unterschiedliche Volumina an Hydroxyethylstärke-Lösung mittels Spritze und Kanüle zum Granulozytenkonzentrat hinzugegeben. Auch bei diesen Versuchsanordnungen wurde ausschließlich Infukoll® HES 6 % (Mw 200.000) der Serumwerke Bernburg AG verwendet.

Tab. 7 In downscaling-Versuchen getestete HES-Granulozytenkonzentrat-Verhältnisse

20ml-Spritze			30ml-Spritze
1 : 0,25	1 : 0,5	1 : 1	1 : 2
10ml Granulozytenkonzentrat			
2,5ml HES	5ml HES	10ml HES	20ml HES

Nach Zugabe der HES-Lösung wurden die Spritzen vorsichtig geschwenkt, so dass sich Granulozytenkonzentrat und Sedimentationsbeschleuniger gut mischen und dann aufrecht auf dem Kolben stehend für die Sedimentation mittels einfacher Schwerkraft gelagert (Abb. 10).



Abb. 10 Versuchsaufbau zur Testung des optimalen GK-HES-Volumenverhältnisses

Nach ca. 45 Minuten und einer Sichtkontrolle auf eine klare Trennlinie zwischen leukozytenhaltigem Überstand und Erythrozytenpellet wurde der Überstand mittels sterilem Schlauchstück, das über einen Luer-Anschluss mit der Spritze verbunden wurde, nach oben in jeweils ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen abgedrückt (Abb. 11). Das in der Spritze verbleibende Erythrozytenpellet wurde im Anschluss verworfen.



Abb. 11 Abdrücken des leukozytenhaltigen Überstandes in ein Zentrifugationsröhrchen

Die gewonnenen Überstände wurden anschließend bei 4°C und 300 x g in einer Tischzentrifuge 5 Minuten zentrifugiert. Der HES-haltige Überstand wurde abgenommen und verworfen. Um die in den Leukozytenpellets enthaltenen Thrombozyten zu entfernen, wurden die Pellets in 0,9%iger Kochsalzlösung resuspendiert und wiederum bei 4°C und 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der thrombozytenhaltige Überstand wurde abgenommen und verworfen. Der beschriebene Waschschrift wurde in identischer Weise wiederholt. Im Anschluss an die beiden Waschschrift mit NaCl-Lösung (0,9%) wurden die Leukozytenpellets in 10 ml blutgruppenidentischen CPD-Plasma aufgenommen.

3.5.1.3 Verschiedene Hydroxyethylstärke-Varianten

Neben dem bei der Herstellung von Standard-Granulozytenkonzentraten verwendeten Infukoll® HES 6 % (Mw 200.000) der Serumwerke Bernburg AG sind aber weitere als Arzneimittel zugelassene Hydroxyethylstärke-Lösungen mit unterschiedlichen Molekulargewichten wie das Infukoll® HES 6 % (Mw 450.000) bekannt.

Für die vergleichenden Versuche zwischen der hochmolekularen (Mw 450.000) und der mittelmolekularen (Mw 200.000) HES-Lösung wurden jeweils 15 ml Granulozytenkonzentrat in 30 ml-Spritzen aufgenommen. Anschließend wurden mittels Spritze und Kanüle 7,5 ml der entsprechenden HES-Lösung zu je einer Spritze gegeben, durch sanftes Schwenken gemischt und auf dem Kolben stehend für die Sedimentation gelagert. Nach Sichtkontrolle auf eine deutliche Abgrenzung zwischen den pelletierten Erythrozyten und den im Überstand befindlichen Leukozyten wurde dieser über ein steriles Schlauchstück in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen nach oben abgedrückt. Das in der Spritze verbleibende Erythrozytenpellet wurde verworfen. Der überführte Überstand wurde bei 4°C und 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde

der Überstand abgenommen, verworfen und das Leukozytenpellet in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Nach der folgenden Zentrifugation (4°C, 300 x g, 5 min) wurde der Waschschriff mit 0,9%iger NaCl-Lösung wiederholt und das Zellpellet im Anschluss an die Zentrifugation in blutgruppenidentischem CPD-Plasma aufgenommen.

3.5.2 Stufe II - Upscaling Versuche

Um einer späteren praktikablen Umsetzung des Aufreinigungsprozesses näher zu kommen, erfolgte in Upscaling-Versuchen die Sedimentation direkt im Spendenbeutel. Dabei wurden die Versuchsbedingungen genutzt, die sich in den Downscaling-Versuchen als die optimalen herausgestellt hatten.

Für die Experimente wurde der GK-Spendenbeutel unter der Sterilwerkbank am Port mit einem sterilen, verschlossenen Dorn (zur Probenentnahme und Überführung des Überstands) versehen. Anschließend wurde entsprechend dem GK-Volumen die Hälfte des Volumens an HES 6 % (Mw: 200.000) über den Port und eine 50 ml-Spritze dazugegeben, der Beutel durch Kneten gut durchmischt und anschließend mit dem Port nach oben an einem geeigneten Gestell in der Blutpresse hängend befestigt (Abb. 12).



Abb. 12 Versuchsaufbau für die Sedimentationsphase während der Upscaling-Versuche

Nach einer ca. 40-minütigen Sedimentationsphase wurde das Granulozytenkonzentrat auf eine klare Trennschicht zwischen dem Leukozytenüberstand und dem Erythrozytenpellet kontrolliert. Der helle, leukozytenhaltige Überstand wurde anschließend über einen sterilen Luerschlauch mittels manueller Blutpresse nach oben in mehrere 50 ml-Zentrifugenröhrchen abgedrückt. Nach einer ersten Zentrifugation (300 x g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, die Pellets in 20 ml 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C). Der Waschschriff mit 0,9%iger NaCl-Lösung wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach der abschließenden Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die entstandenen Granulozytensediment in CPD-Plasma resuspendiert und zusammengeführt. Das verwendete Volumen an CPD-Plasma entsprach dabei dem Ausgangsvolumen des Granulozytenkonzentrates.

3.5.3 Stufe III - Versuche im geschlossenen System

Damit eine spätere Abarbeitung in einer transfusionsmedizinischen Abteilung umsetzbar ist und das gereinigte Granulozytenkonzentrat als potentielles Blutprodukt in der Humanmedizin angewendet werden kann, muss der Prozess der Aufreinigung in einem komplett geschlossenen Beutelsystem durchführbar sein. Für die dritte Entwicklungsstufe der Aufreinigung wurde an den Granulozytenkonzentratbeutel ein mit 150 ml Infukoll® HES 6 % befüllter Plasmabeutel über Sterilkonnektierung angeschlossen, die Hydroxyethylstärke zum Granulozytenkonzentrat dazugegeben und beides durch Kneten gut durchmischt. Der leere HES-Beutel wurde steril vom GK-Beutel abgeschweißt und ein leerer Plasmabeutel über Sterilkonnektierung angeschlossen. Das entstandene Beutelsystem wird mit der Schlauchverbindung nach oben für die Sedimentation direkt in der manuellen Blutpresse aufgehängt. Nach ca. 40 min Sedimentation wurde auf eine klare Trennschicht visuell kontrolliert. Der helle leukozytenhaltige Überstand wurde nach der Sedimentationsphase über die Schlauchverbindung mittels manueller Blutpresse nach oben in den Leerbeutel abgedrückt. Der mit der Leukozytensuspension gefüllte Blutbeutel wird steril abgeschweißt. Vor der Zentrifugation (300 x g, 5 min, 4 °C) wurde dieser Blutbeutel mit einem weiteren Leerbeutel steril verbunden, in den der Überstand anschließend abgepresst und verworfen wurde. Der Waschschrift, bei dem ein Beutel mit 0,9%iger NaCl-Lösung steril angeschlossen, das Pellet in ca. 250 ml resuspendiert und nach Sterilkonnektierung eines neuen Leerbeutels das komplette Beutelsystem zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C) wurde, wurde zwei Mal durchgeführt. Der Überstand des zweiten Waschschriftes wurde abgepresst, ein mit CPD-Plasma gefüllter Beutel steril konnektiert und das entstandenen Granulozytenpellet in ca. 150 ml CPD-Plasma resuspendiert. Der komplette Entwicklungsprozess der Aufreinigung eines Granulozytenkonzentrates ist in Abb. 13 nochmals schematisch dargestellt.

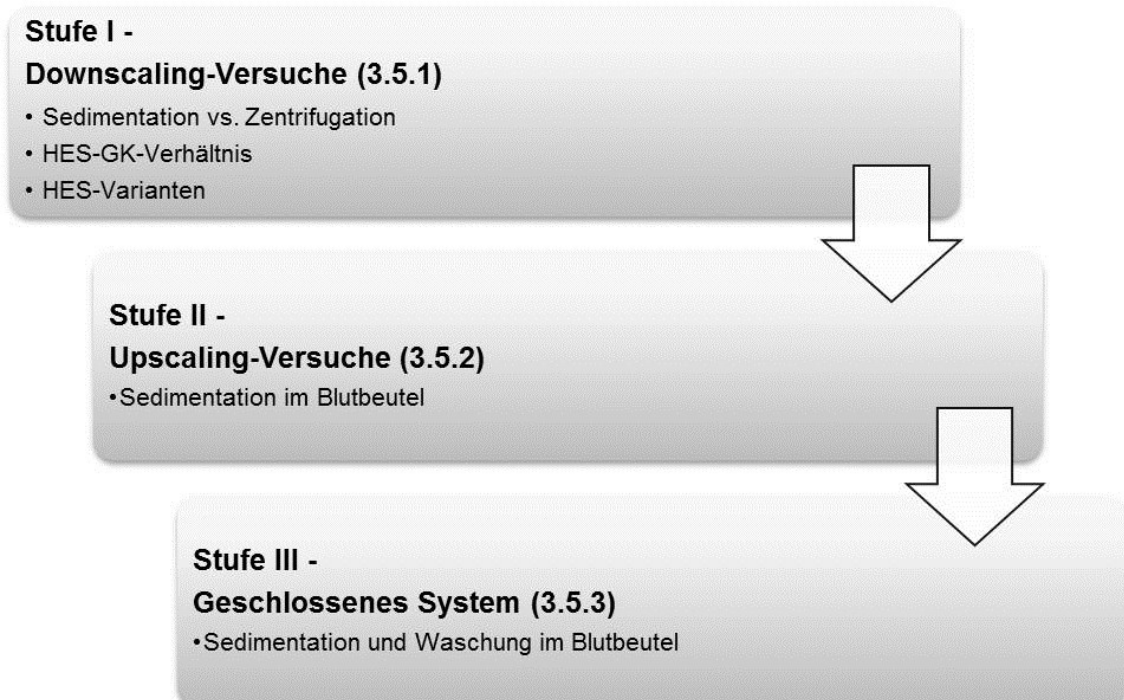


Abb. 13 Entwicklungsschema des Aufreinigungsprozesses für Granulozytenkonzentrate

3.6 Entwicklung der Lagerungsbedingungen

Um die bestmöglichen Lagerungsbedingungen für gereinigte Granulozytenkonzentrate zu finden, wurden während dieser Dissertation in stets parallel laufende Vergleichsexperimente verschiedene Parameter, wie unter 3.6.1 bis 3.6.5 beschrieben, getestet. Jedes dieser vergleichenden Lagerungsexperimente wurde mindestens drei Mal durchgeführt. Für die Untersuchung der Granulozytenqualität wurden die unter Punkt 1.1.1 bis 3.3.7 beschriebenen Methoden zu den Zeitpunkten 0h, 24h, 48h und 72h durchgeführt. Die optimalen Lagerungsvarianten wurden in die folgenden Testungen übernommen, so dass die Experimente inhaltlich aufeinander aufbauen (Abb. 14).

3.6.1 Temperatur

In dieser Versuchsreihe sollte die optimale Lagerungstemperatur, die in einer transfusionsmedizinischen Einrichtung auch umsetzbar wäre, ermittelt werden. Hierfür wurde das gereinigte Granulozytenkonzentrat mit einer Zellkonzentration von 1×10^7 Leukozyten/ml in 20 ml unfiltriertem CPD-Plasma (Gesamtzellzahl: 2×10^8 Leukozyten) in 75T-Zellkulturflaschen mit gaspermeablem Verschluss bei 4 °C (Kühlschrank), Raumtemperatur und 37 °C (CO₂-Brutschrank) gelagert.

3.6.2 Bewegung

Um den Einfluss von Bewegung auf die Qualität der gelagerten Granulozyten zu untersuchen, wurden diese nach der Aufreinigung mit einer Zellkonzentration von 5×10^6 Leukozyten/ml in 40 ml unfiltriertem CPD-Plasma (Gesamtzellzahl: 2×10^8 Leukozyten) in Plasmabeuteln (aus dem 4er-Set) bei Raumtemperatur gelagert. Jeweils ein Beutel wurde dabei unbewegt bzw. durch einen Schüttler bewegt (Drehzahl von 170 min^{-1}) aufbewahrt.

3.6.3 Zellkonzentration

Um austesten zu können, ob unterschiedliche Zellkonzentrationen die Granulozytenqualität während der Lagerung beeinflussen, wurden in dieser Versuchsreihe eine gereinigte Leukozytensuspension mit einer Zellkonzentration von 5×10^6 bzw. $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ in 40 ml unfiltriertem CPD-Plasma (Gesamtzellzahl: 2×10^8 bzw. 4×10^9 Leukozyten) in kleinen Plasmabeuteln (aus 4er-Set) unbewegt bei Raumtemperatur gelagert und untersucht.

3.6.4 Lagerungsbeutel

Da durch höhere Gesamtzellzahlen neben der Granulozytenqualität auch die physiologischen Lagerungsbedingungen (pH-Wert, Partialdrücke der Blutgase) beeinflusst werden können, sollte in diesem Experimentalansatz getestet werden, ob das Verwenden eines anderen Blutbeutels einen positiven Einfluss auf die genannten Parameter hat. Hierfür wurden in einem Thrombozytenlagerungsbeutel 5×10^7 Leukozyten/ml in 200 ml unfiltriertem CPD-Plasma (Gesamtzellzahl: 1×10^{10} Leukozyten) bei Raumtemperatur unbewegt gelagert.

3.6.5 Lagerungsmedium

Da konventionell hergestelltes CPD-Plasma noch viele lösliche Plasmabestandteile (Gerinnungsfaktoren, Antikörper, Lipide) enthält, die auf die gelagerten Granulozyten einen Einfluss haben können, wurden in diesem vergleichenden Lagerungsansatz 5×10^7 Zellen/ml in 200 ml unfiltriertem bzw. in 200 ml über einen $0,2 \mu\text{m}$ -Sterilfilter filtriertem CPD-Plasma (Gesamtzellzahl: 1×10^{10} Leukozyten) bei Raumtemperatur unbewegt gelagert. In Abb. 14 wurde die Entwicklung der Lagerung von gereinigten Granulozytenkonzentraten schematisch zusammengefasst und dargestellt.



Abb. 14 Entwicklungsschema der Lagerung gereinigter Granulozytenkonzentrate

3.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics 21 für Microsoft Windows.

Da für jede einzelne Versuchsreihe immer nur eine kleine Stichprobenzahl zur Verfügung stand, wurde auf eine Prüfung der Normalverteilung verzichtet. Zur Auswertung und statistischen Beschreibung der Ergebnisse wurde der Median und die Spannweite (Minimum bis Maximum) herangezogen, die im Folgenden als Median (Spannweite) dargestellt wurden.

Zum Vergleich der Parameter vor und nach der Aufreinigung und zur Analyse des Lagerungsverlaufs eines einzelnen Parameters wurde der Wilcoxon-Test für zwei abhängige Stichproben (Bsp.: GK Leukozyten vs. gGK Leukozyten) genutzt. Um die Resultate der einzelnen Parameter während der Lagerung zu einem bestimmten Zeitpunkt miteinander vergleichen und statistisch auswerten zu können, wurde der Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Stichproben (Bsp.: Zellzahl unbewegte Lagerung 0h vs. Zellzahl bewegte Lagerung 0h) verwendet.

Statistische Unterschiede wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ als signifikant und bei $p<0,001$ als hochsignifikant betrachtet. Die ermittelten Signifikanzen wurden durch * für $p<0,05$ bzw. ** für $p<0,001$ in den Diagrammen sichtbar gemacht. Waagerechte Linie markieren dabei die verglichenen Stichproben.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse und Parameterverläufe erfolgte entweder mit Hilfe von Säulendiagrammen, die mit Microsoft Excel 2010 angefertigt wurden und den Mittelwert mit Standardabweichung abbilden, oder mit Boxplot-Diagrammen, die mit der Software Sigma Plot 12.5 erstellt wurden. Die Box umfasst dabei den Bereich zwischen 1. und 3. Quartil. Der Median ist als waagerechte Linie innerhalb des Boxplots verzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Standard-Granulozytenkonzentrate

Für die verschiedenen Versuchsreihen dieser Dissertation wurden insgesamt 45 Standard-Granulozytenkonzentrate von dem Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock im Zeitraum von Juni 2010 bis Juni 2014 bezogen. Alle verwendeten GK wurden wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben hergestellt.

Das mittlere Volumen der Präparate lag bei 311 (104) ml. Der Median der Leukozytenzellzahl lag bei $33,6 \times 10^9$ ($38,8 \times 10^9$). Der granulozytäre Anteil lag mit $25,2 \times 10^9$ ($38,5 \times 10^9$) Zellen bei 75 %. Die Gesamtzellzahl der Lymphozyten und Monozyten wurde mit $4,0 \times 10^9$ ($6,2 \times 10^9$) bzw. $4,5 \times 10^9$ ($5,4 \times 10^9$) ermittelt und machte somit 12 % bzw. 13 % der leukozytären Bestandteile aus.

Die verwendeten Standard-Granulozytenkonzentrate enthielten ebenfalls 690×10^9 (810×10^9) Erythrozyten und 103×10^9 (109×10^9) Thrombozyten. Der Hämatokrit lag bei 20,8 (23,2) %. Die verwendeten Granulozytenkonzentrate erfüllten somit die Qualitätskriterien der Richtlinien der Bundesärztekammer [23].

Um die Granulozytenkonzentrate besser charakterisieren zu können und Vergleichswerte für die weiteren Versuche zu haben, wurden zusätzlich die Vitalität und der prozentuelle Anteil an phagozytierenden und oxidierenden Granulozyten/Monozyten ermittelt. Die Vitalität der Präparate lag bei 92,2 (33,4) %. Bei durchschnittlich 98,51 (13,58) % der enthaltenen Granulozyten konnte eine Phagozytoseaktivität nachgewiesen werden. Der Anteil der Oxyburst-aktiven Zellen lag bei 99,84 (16,34) %.

Eine detaillierte Parameterübersicht der einzelnen Granulozytenkonzentrate ist im Anhang (9.3) zu finden.

Tab. 8 Zusammenfassung des Volumens, der zellulären (Gesamtzellzahl/GK, Hämatokrit, Vitalität) und funktionellen (Anteil der phagozytierenden bzw. Oxyburst-aktiven Zellen) Parameter der verwendeten Standard-Granulozytenkonzentrate

	Volumen [ml]	Leukozyten $\times 10^9$	Lymphozyten $\times 10^9$	Monozyten $\times 10^9$	Granulozyten $\times 10^9$	Erythrozyten $\times 10^9$	Thrombozyten $\times 10^9$	Hämatokrit [%]	Vitalität Leukozyten [%]	Phagozytose [%]	Oxyburst [%]
Median	311	33,6	4,0	4,5	25,2	690	103	20,8	92,2	98,51	99,84
Spann- weite	104	38,8	6,2	5,4	38,5	810	190	23,2	33,4	13,58	16,34

4.2 Entwicklung des Aufreinigungsprozesses von Granulozytenkonzentrat

Die Entwicklung des Aufreinigungsprozesses umfasste 3 Stufen. In Stufe I (Downscaling Versuche) wurden dabei, basierend auf vorherigen Forschungsergebnissen [41], verschiedene Parameter (Sedimentation vs. Zentrifugation, Volumenverhältnis zwischen Hydroxyethylstärke (HES) und Granulozytenkonzentrat, HES mit unterschiedlichen Molekülmassen) getestet.

Die dabei erzielten Erkenntnisse flossen in die Upscaling Versuche in der Entwicklungsstufe 2 ein. Letztendlich wurde in Stufe 3 der Prozess so weiterentwickelt, dass er nach transfusionsmedizinischen Richtlinien im geschlossenen System durchführbar ist. In Abb. 15 ist der gesamte Prozess mit seinen einzelnen Entwicklungsstufen nochmals dargestellt.

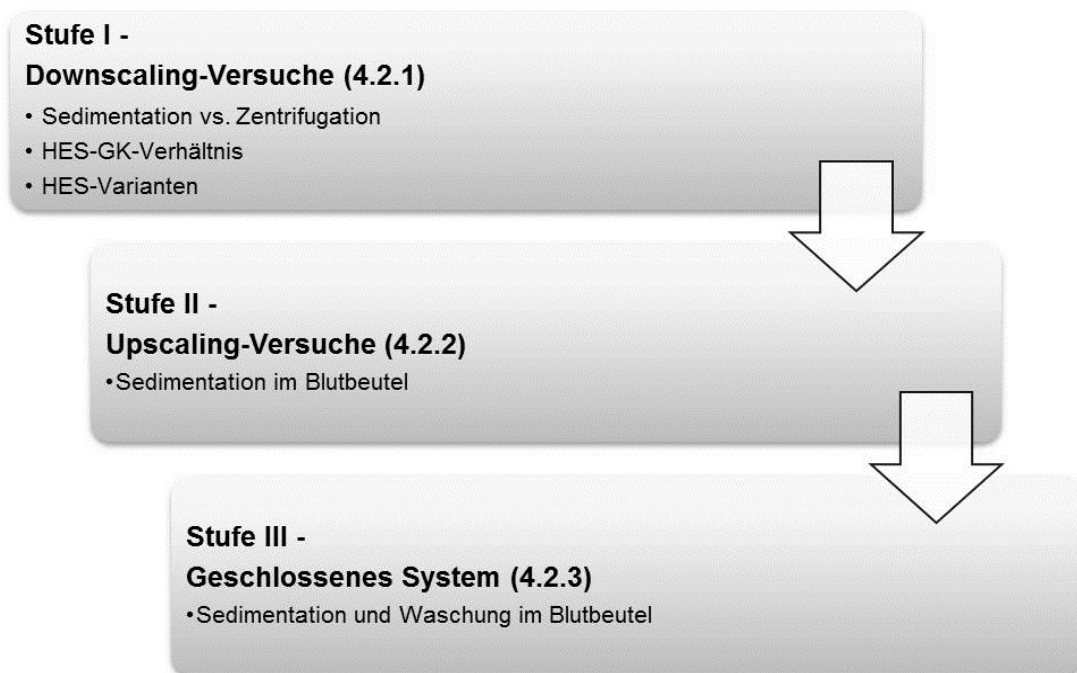


Abb. 15 Schematische Darstellung der drei Entwicklungsstufen der Aufreinigung

4.2.1 Stufe I - Downscaling Versuche

4.2.1.1 Sedimentation vs. Zentrifugation

Auf Grund der Erkenntnisse aus früheren Forschungsergebnissen [41] war bekannt, dass die einfache Sedimentation eine Zeitspanne von 35 - 40 min benötigt. Diese Zeit und somit der gesamte Prozess der Aufreinigung eines Granulozytenkonzentrates sollte durch Zentrifugation verkürzt werden.

In Abb. 16A wird sichtbar, dass der prozentuale Anteil an Leukozyten bei der Aufreinigung mittels Sedimentation mit 74,5 % deutlich höher ausfällt als bei der Methode mit Zentrifugation. Dort lag der Leukozytengehalt im gereinigten Granulozytenkonzentrat lediglich bei 34,0 %. Auch die Reduktion der Erythrozyten in den Präparaten wies Unterschiede auf. Lag der Restgehalt an roten Blutzellen bei dem Zentrifugationsansatz noch bei 13,2 %, so konnte der Anteil der verbleibenden Erythrozyten im gGK durch Sedimentation auf 2,5 % reduziert werden. Die

Abreicherung der Thrombozyten wurde jedoch durch die beiden unterschiedlichen Methoden nicht beeinflusst und lag bei einem Restanteil von 3,6 %.

Vergleicht man die prozentualen Anteile der einzelnen Leukozytensubpopulationen (Abb. 16B) in den gereinigten Granulozytenkonzentraten, so wird deutlich, dass der Verlust am stärksten bei den Lymphozyten ausfällt. Lediglich 45,2 % dieser Leukozytenart konnten bei der Aufreinigung mit Sedimentation und nur 21,0 % bei der mit Zentrifugation wiedergefunden werden. Der verbliebene Anteil an Monozyten und Granulozyten lag hingegen bei der Sedimentationsaufreinigung bei 82,4 % bzw. 78,7 % und fiel damit deutlich höher aus, als bei der Zentrifugationsmethode mit 39,9 % bzw. 35,6 %.

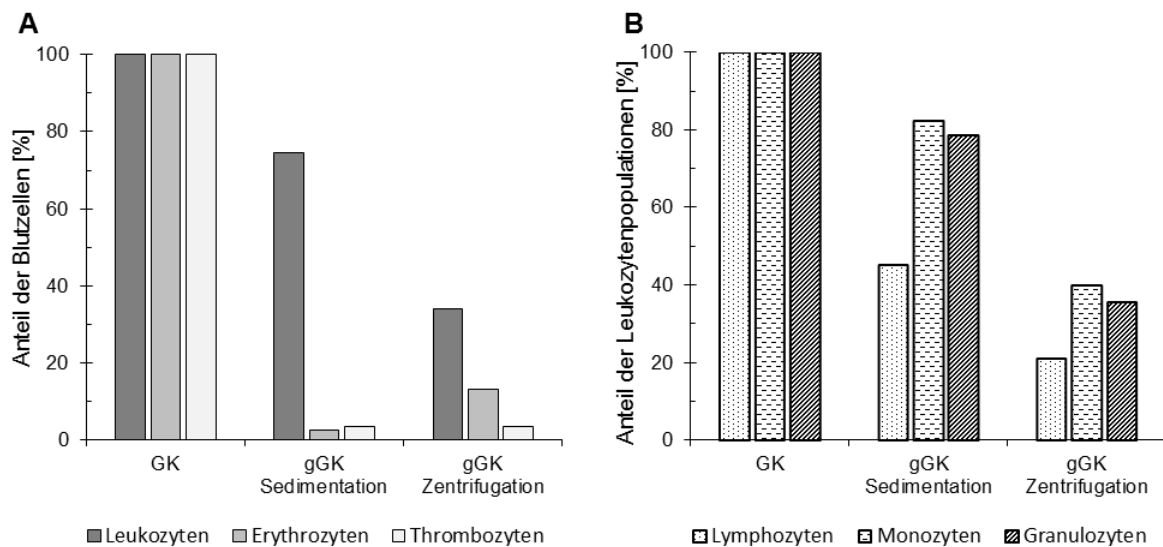


Abb. 16 Prozentualer Anteil der (A) verschiedenen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen nach Aufreinigung mit einfacher Sedimentation oder Zentrifugation (n = 1)

4.2.1.2 Verhältnis zwischen Granulozytenkonzentrat und Hydroxyethylstärke

Da die bisherigen Erkenntnisse [41] über das Volumenverhältnis zwischen Blutprodukt und Hydroxyethylstärke auf Basis von Buffy Coats erzielt wurden und diese eine andere zelluläre Zusammensetzung haben als Granulozytenkonzentrate und außerdem die GKs schon etwas Hydroxyethylstärke von der Präparation enthielten, wurden in diesem Entwicklungsabschnitt verschiedene Zusammensetzungen zwischen Granulozytenkonzentrat und Hydroxyethylstärke getestet (Vgl. 3.5.1.2). Ziel war dabei, eine bestmögliche Reduktion der Erythrozyten bei höchstmöglicher Leukozytenausbeute mit gleicher bzw. verbesserter Funktionalität zu erreichen. Betrachtet man den prozentualen Anteil an Leukozyten nach der Aufreinigung (Abb. 17A) wurde sichtbar, dass durch die GK-HES-Zusammensetzung im Verhältnis 1:1 und 1:0,5 die höchsten Gewinne an Leukozyten erzielt werden konnten. So lag der Anteil beim Verhältnis 1:1 bei 77,9 % und bei 1:0,5 bei 76,6 %. Die beiden GK-HES-Verhältnisse 1:0,25 und 1:2 fielen mit Restgehalten von 62,3 % und 68,6 % an Leukozyten deutlich geringer aus. Die stärkste Reduktion an Erythrozyten mit einem Anteil von 1,2 % wurde beim GK-HES-Verhältnis von 1:0,25 gemessen. Mit Zunahme des Volumens an Hydroxyethylstärke nahm die Abreicherung an roten Blutzellen minimal ab. So blieben bei einem GK-HES-Verhältnis von 1:0,5 noch 2,2 % und bei den

Verhältnissen 1:1 und 1:2 noch 3,3 % bzw. 3,7 % der Erythrozyten im gereinigten Granulozytenkonzentrat zurück. Die Abreicherung an Thrombozyten zeigte keine entscheidenden Unterschiede zwischen den getesteten Verhältnissen. So wurde bei einem Verhältnis von 1:0,25 noch ein Restgehalt von 5,4 %, bei 1:0,5 von 5,7 %, bei 1:1 von 5,4 % gemessen. Lediglich bei der GK-HES-Zusammensetzung von 1:2 konnte eine minimal höhere Abreicherung des Thrombozytenanteils auf 3,3 % erzielt werden. Die Vitalität der Leukozyten nach der Aufreinigung (Abb. 17B) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Testansätzen.

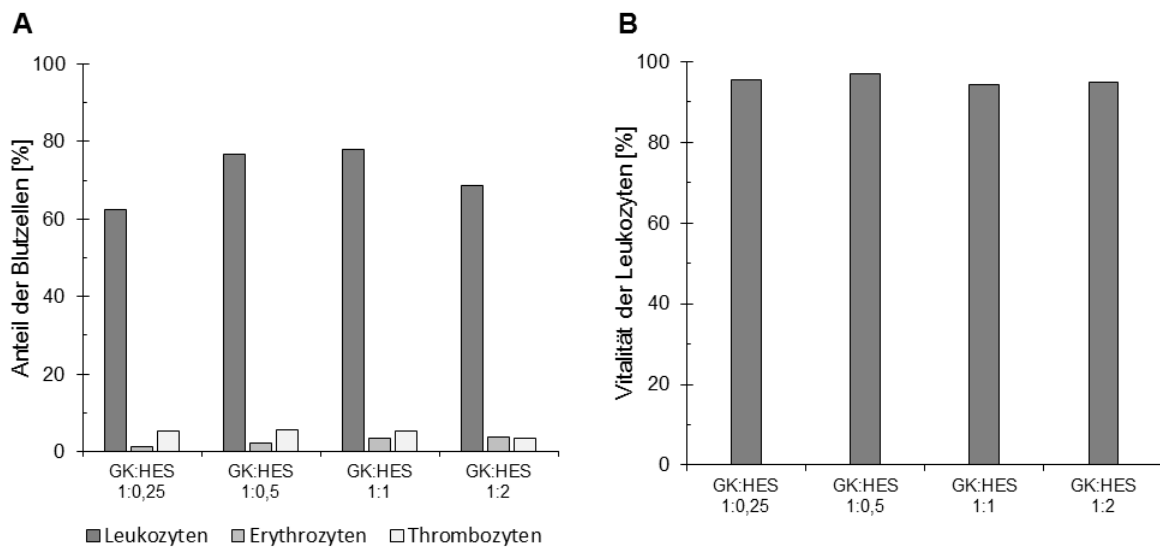


Abb. 17 (A) Prozentualer Anteil der Blutbestandteile (GK = 100 %) und (B) Vitalität der Leukozyten nach Aufreinigung mit unterschiedlichen Granulozytenkonzentrat-Hydroxyethylstärke-Verhältnissen (GK:HES) (n = 1)

Insgesamt wurden 12 Standard-Granulozytenkonzentrate mittels Sedimentation im Verhältnis 1:0,5 aufgereinigt und anschließend analysiert. In Abb. 18A wird sichtbar, dass 76,9 % der Leukozyten im gereinigten Granulozytenkonzentrat wiedergefunden werden konnten. Untersucht man die verbliebenen Leukozyten in Hinblick auf ihre Subpopulationen detaillierter, ist erkennbar, dass der größte Verlust bei den Lymphozyten zu verzeichnen ist (Abb. 18B). Die Monozyten und Granulozyten sind hingegen mit 88,1 % und 82,0 % im gereinigten Präparat vertreten. Außerdem konnte durch die angewandte Aufreinigungsmethode der Anteil an Erythrozyten (1,4 %) und Thrombozyten (5,9 %) signifikant reduziert werden konnte.

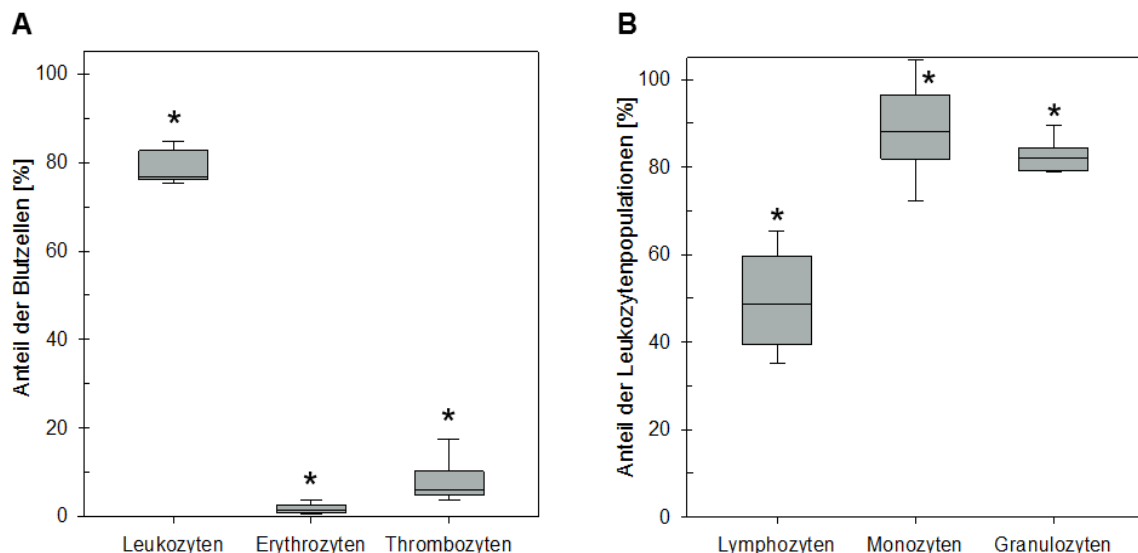


Abb. 18 Prozentualer Anteil der (A) einzelnen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen im gereinigten Granulozytenkonzentrat nach Aufreinigung im GK-HES-Verhältnis 1:0,5 (n = 12; *p<0,05 bezogen aufs GK)

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Vitalität der Leukozyten durch die Aufreinigung nicht beeinträchtigt, sondern sogar minimal verbessert wurde. So stieg der Anteil der vitalen Zellen von 94,1 % auf 95,6 % (Abb. 61A, Anhang 9.4.1). Auch eine Schädigung der Zellen durch den Aufreinigungsprozess kann auf Grund der LDH-Konzentration ausgeschlossen werden. So sank die Konzentration von 246 U/l im GK auf 192 U/l im gereinigten Präparat (Abb. 61B).

Der prozentuale Anteil phagozytierender und Oxyburst betreibender Monozyten und Granulozyten im gereinigten Granulozytenkonzentrat wurde nicht beeinflusst und blieb konstant bei annähernd 100 % (Abb. 61C und E). Durch die Aufreinigung war jedoch ein Anstieg der Oxyburst-Leistung der Zellen zu verzeichnen, der aber nicht signifikant ausfiel (Abb. 61F). Lediglich die Phagozytose-Leistung der Granulozyten und Monozyten wies eine minimale, aber nicht signifikante Verschlechterung auf und sank gegenüber dem Niveau des Standard-Granulozytenkonzentrates auf 85,1 % (Abb. 61D). Die Diagramme zu den beschriebenen Daten sind im Anhang unter Kapitel 9.4.1 einzusehen.

4.2.1.3 Verschiedene Hydroxyethylstärke-Varianten

Neben dem bei der Granulozytenkonzentrat-Herstellung verwendeten Infukoll® HES 6 % (Mw: 200.000), kurz HES 200, wurde auch eine hochmolekulare Variante (Mw: 450.000), kurz HES 450, getestet. Ziel war eine bessere Abreicherung von Erythrozyten und Thrombozyten bei gleichzeitig höherer Ausbeute an Leukozyten.

In der Analyse der prozentualen Anteile der Blutzellen (Abb. 19A) bzw. der Leukozytensubpopulationen (Abb. 19B) zeigten sich nur minimale Unterschiede zwischen den beiden verglichenen HES-Varianten, die für HES 200 etwas positiver ausfielen. So enthielt das mit HES 200 gereinigte GK 76,1 % der Leukozyten des Ausgangspräparates und beim HES 450 nur noch 73,2 %. Dieser minimal geringere Restgehalt spiegelte sich auch in den Subpopulationen wider. So wurden beim HES 200 noch 51,8 % Lymphozyten, 88,1 % Monozyten und 78,7 % Granulozyten des GKs gemessen. Beim HES 450 gestaltete sich der Restgehalt wie

folgt: 46,1 % Lymphozyten, 85,5 % Monozyten und 76,3 % Granulozyten. Auch die Abreicherung an Erythrozyten fiel durch das verwendete HES 200 deutlicher aus. So wurden nach der Aufreinigung noch 3,4 % der Erythrozyten im gGK zu messen. Beim HES 450 lag der Anteil bei 4,2 %. Lediglich der Thrombozyten-Anteil im gGK war beim HES 450 mit 7,8 % etwas geringer als beim HES 200 (8,0 %).

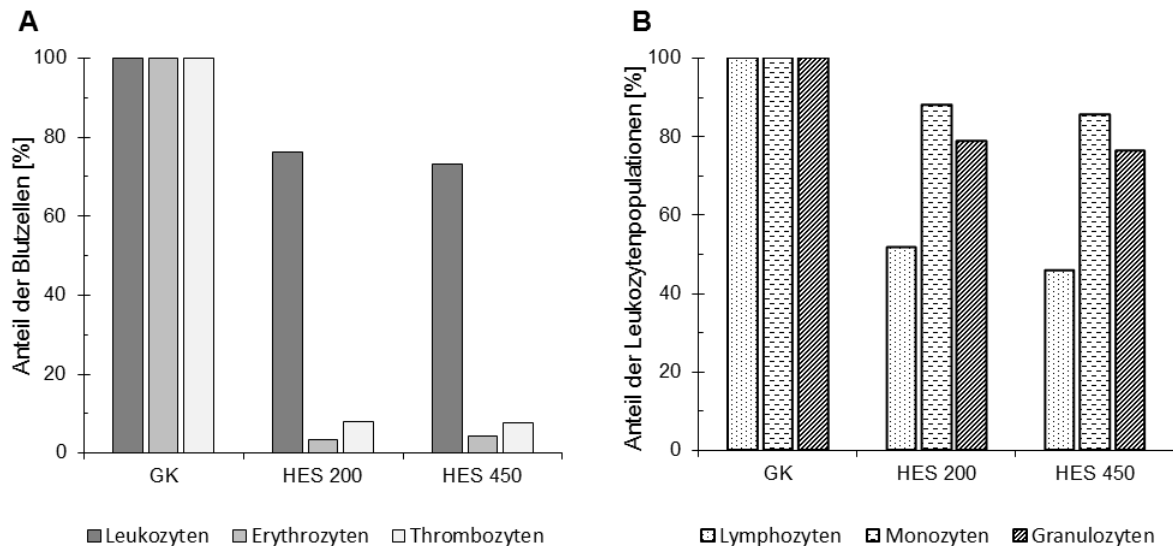


Abb. 19 Prozentualer Anteil der (A) verschiedenen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen nach Aufreinigung mit Infukoll® HES 6 % Mw 200.000 bzw. Mw 450.000 (n = 1)

4.2.2 Stufe II - Upscaling-Versuche

Um einer Durchführung des Aufreinigungsprozesses im geschlossenen System näher zu kommen, wurden die Erkenntnisse aus den vorangegangenen Experimenten in einem ersten Zwischenschritt (Upscaling-Versuche) soweit übertragen, dass die Sedimentation des Standard-Granulozytenkonzentrates im GK-HES-Verhältnis 1:0,5 komplett im Spendenbeutel durchgeführt wurde (Vgl. 3.5.2). Innerhalb dieser Entwicklungsstufe II wurden insgesamt 11 Granulozytenkonzentrate aufgereinigt und anschließend analysiert.

Auch durch die komplette Sedimentation des Standard-Granulozytenkonzentrates im Spendenbeutel mit anschließender Waschung in Zentrifugenröhrchen konnten die Ergebnisse der Downscaling-Versuche annähernd reproduziert werden. So wurden 67,8 % der Leukozyten aus dem Ausgangspräparat im gereinigten Granulozytenpräparat wiedergefunden (Abb. 20A). Lediglich ein Anteil von 37,0 % der Ausgangszellmasse konnte für die Lymphozyten im gereinigten Präparat gemessen werden. Sie wiesen somit erneut die stärksten Verluste auf und bestätigten die Ergebnisse aus den Downscaling-Versuchen. Der Restgehalt an Monozyten lag bei 78,2 % und für die Subpopulation der Granulozyten bei 72,3 % (Abb. 20B).

Die deutliche Abreicherung an Erythrozyten aus den Downscaling-Versuchen konnte ebenfalls erreicht werden. So lag der prozentuale Restgehalt roter Blutkörperchen bei 1,2 % des Ausgangsproduktes (Abb. 20A). Die Reduktion des Thrombozytengehalts konnte durch die Vergrößerung des Aufreinigungsprozesses sogar leicht verbessert werden. Es wurde nach der Sedimentation im Spendenbeutel und der anschließenden Waschung in Zentrifugenröhrchen noch 4,6 % der Thrombozyten wiedergefunden (Abb. 20A).

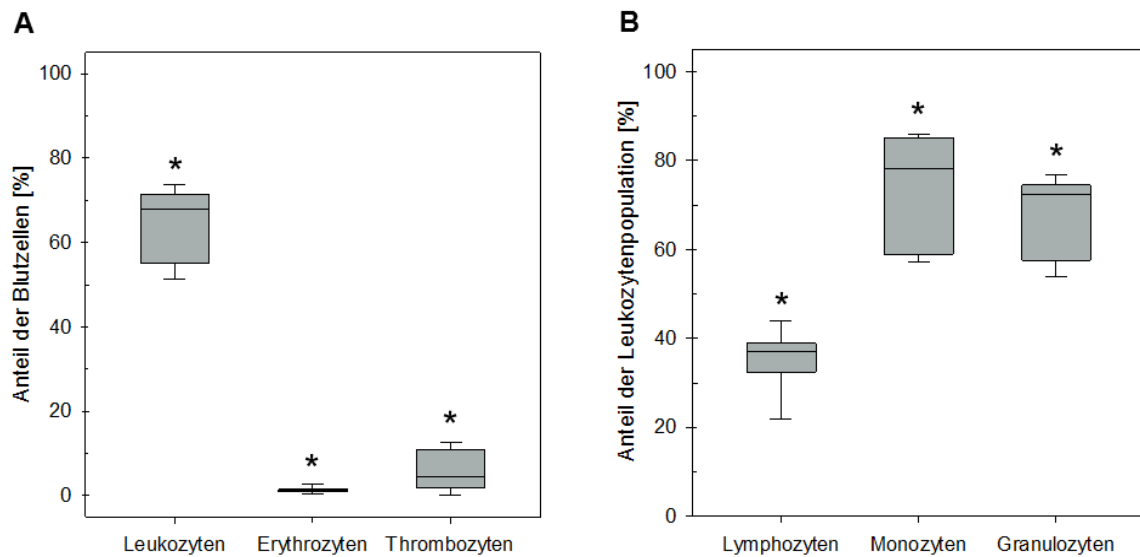


Abb. 20 Prozentualer Anteil der (A) einzelnen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen im gereinigten Granulozytenkonzentrat nach Aufreinigung durch Sedimentation im Spendenbeutel (n = 11; *p<0,05 bezogen aufs GK)

Auch die Erkenntnisse aus den Downscaling-Versuchen hinsichtlich der Vitalität der Leukozyten und der Zellschädigung anhand der im Plasma gemessenen LDH-Konzentration konnten untermauert werden. Die Vitalität der Leukozyten war sowohl vor als auch nach der Aufreinigung bei 90,0 % und blieb somit über den Prozess stabil (Abb. 62A). So konnte durch die Weiterentwicklung der Aufreinigung die LDH-Konzentration, ein Maß für eine etwaige Zellschädigung, im gereinigten Granulozytenkonzentrat von 273 U/l auf 202 U/l signifikant gesenkt werden (Abb. 62B).

Auch die funktionellen Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse aus den Downscaling-Versuchen. So konnte erneut gezeigt werden, dass sowohl der Anteil der phagozytierenden Monozyten und Granulozyten als auch der Anteil der Oxyburst-aktiven Zellen durch die Aufreinigung nicht beeinträchtigt wurde und stabil auf seinem Niveau von ca. 99 % blieb (Abb. 62C und E). Auch der minimale Anstieg der Oxyburst-Leistung auf ~108,0 % wurde nachgewiesen (Abb. 62F). Eine neue Erkenntnis war, dass der Verlust der Phagozytose-Leistung durch die neue Upscaling-Methode von 14,9 % auf 5,9 % reduziert werden konnte (Abb. 62D). Die Diagramme zu den beschriebenen Daten sind im Anhang unter Kapitel 9.5 aufgeführt.

4.2.3 Stufe III - Geschlossenes System

Ziel der Stufe III war es, den Prozess der Aufreinigung eines Standard-Granulozytenkonzentrates so weiterzuentwickeln, dass dieser komplett in einem geschlossenen Beutelsystem durchführbar ist, und somit in die Herstellungsabläufe einer transfusionsmedizinischen Einrichtung integriert werden könnte. Zielkriterien waren wiederum eine bestmögliche Reduktion der Erythrozyten und Thrombozyten, sowie eine höchstmögliche Ausbeute an funktionsstabilen bzw. -verbesserten Leukozyten. Während dieser Entwicklungsphase III wurden insgesamt 16 Standard-Granulozytenkonzentrate im geschlossenen System aufgereinigt und anschließend strukturell und funktionell untersucht.

4.2.3.1 Vergleich der zelluläre Zusammensetzung der Granulozytenkonzentrate

Durch die Aufreinigung im geschlossenen System konnten 68,2 % der Leukozyten aus dem Ausgangspräparat gewonnen werden (Abb. 21A). Auch bei dieser Aufreinigungsmethode wurde wieder deutlich sichtbar, dass der größte Verlust mit 65,6 % bei den Lymphozyten lag. Bei den Subpopulationen der Monozyten und Granulozyten fiel der Verlust deutlich geringer aus. So wurden noch 69,9 % der Monozyten und 72,8 % der Granulozyten im gereinigten Präparat gemessen (Abb. 21B). Durch den Restanteil von 1,2 % wird die effektive und hochsignifikante Reduktion der Erythrozyten deutlich sichtbar. Die Spannweite von 2,6 deutete dabei auf eine stabile Handhabung während des Aufreinigungsprozesses hin. Auch die Abreicherung von Thrombozyten fiel signifikant aus, sodass ein Restgehalt von 6,2 % in den gereinigten Granulozytenkonzentraten gemessen werden konnte (Abb. 21A).

Bemerkenswert war, dass bei der Aufreinigung im geschlossenen System die Vitalität der Leukozyten des gereinigten Präparats im Vergleich zum Standard-Granulozytenkonzentrat signifikant verbessert werden konnte. So lag die Vitalität vor der Prozessierung bei 87,5 % und stieg im Anschluss auf 92,0 % an (Abb. 21C).

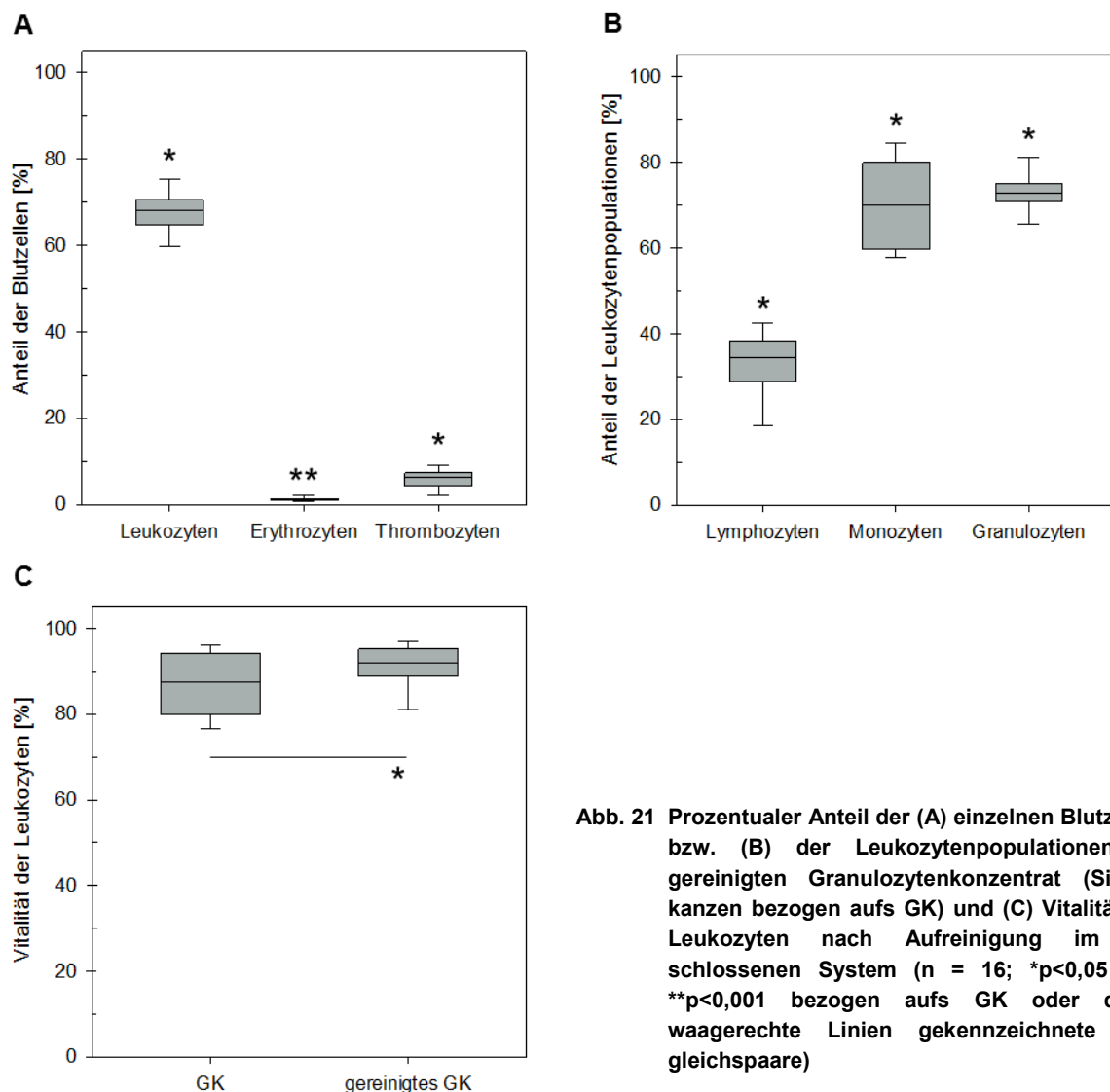


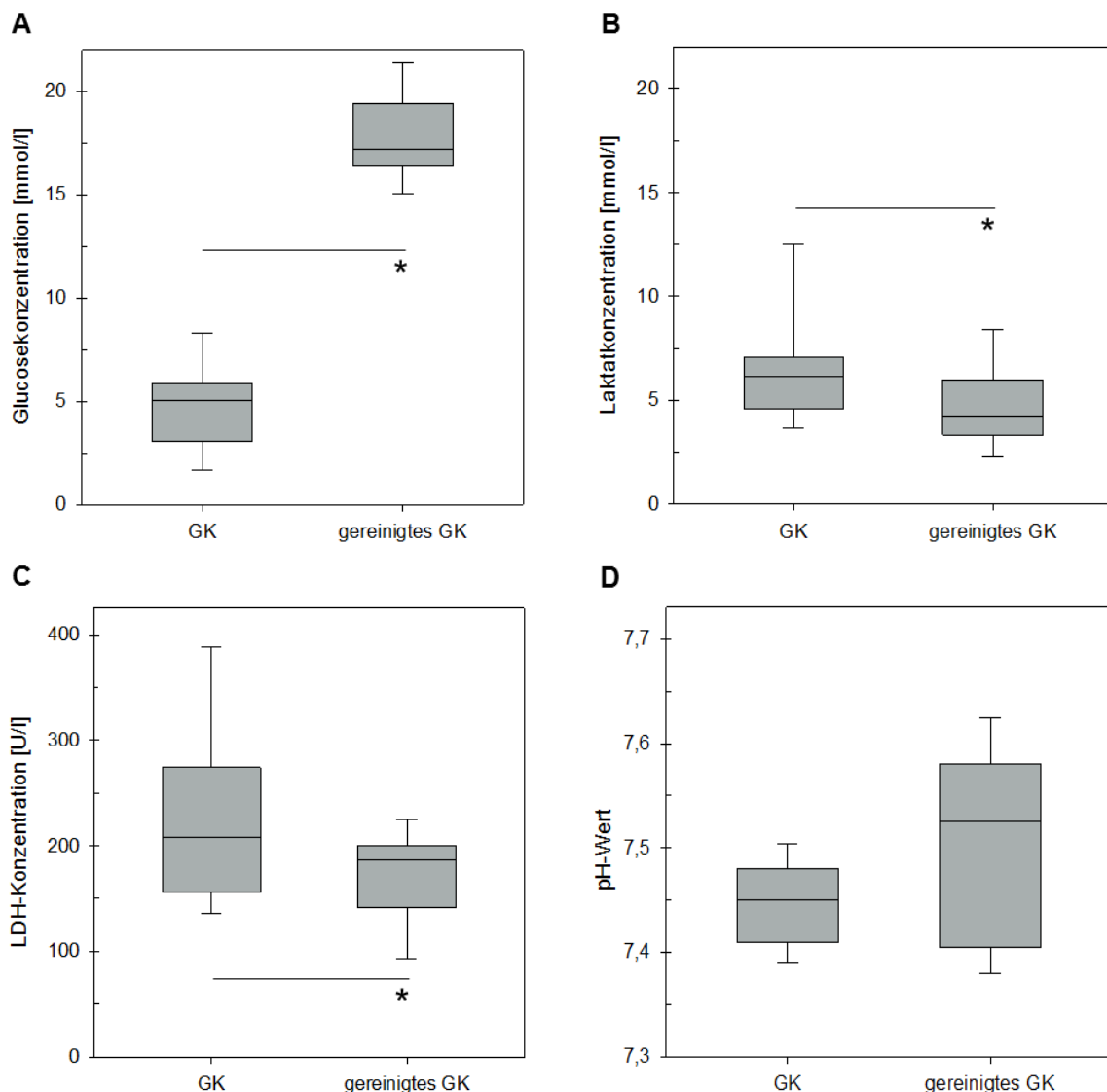
Abb. 21 Prozentualer Anteil der (A) einzelnen Blutzellen bzw. (B) der Leukozytenpopulationen im gereinigten Granulozytenkonzentrat (Signifikanzen bezogen aufs GK) und (C) Vitalität der Leukozyten nach Aufreinigung im geschlossenen System ($n = 16$; * $p < 0,05$ und ** $p < 0,001$ bezogen aufs GK oder durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

4.2.3.2 Vergleich von pH-Werten, Partialdrücken der Blutgase und Glucose-, Laktat- und LDH-Konzentrationen der Granulozytenkonzentrate

Generell ließen sich die physiologischen Bedingungen für die Leukozyten durch die Aufreinigung im geschlossenen System teilweise signifikant verbessern.

Durch die Aufreinigung konnte sowohl die LDH-Konzentration von 208 U/l auf 187 U/l (Abb. 22C) als auch die Laktatkonzentration von 6,1 mmol/l auf 4,2 mmol/l (Abb. 22B) signifikant reduziert werden. Außerdem kam zu einem signifikanten Anstieg der Glukosekonzentration von 5,0 mmol/l auf 17,2 mmol/l (Abb. 22A). Die Ursache für die starke Glukoseerhöhung liegt in der Aufnahme der Zellen im stark glukosehaltigen CPD-Plasma. Der pH-Wert von 7,45 auf 7,52 minimal an (Abb. 22D, nicht signifikant).

Die Partialdrücke der Blutgase zeigten ebenfalls deutliche Veränderungen durch den Aufreinigungsprozess. So konnte der Partialdruck des Sauerstoffs im gereinigten Granulozytenkonzentrat von 22 mmHg auf 77 mmHg gesteigert werden. Die Signifikanz lag dabei bei $p < 0,001$ (Abb. 22E). Der Partialdruck an Kohlenstoffdioxid konnte von 27 mmHg im Standard-Granulozytenkonzentrat auf 17,5 mmHg im gereinigten Präparat ebenfalls signifikant reduziert werden (Abb. 22F).



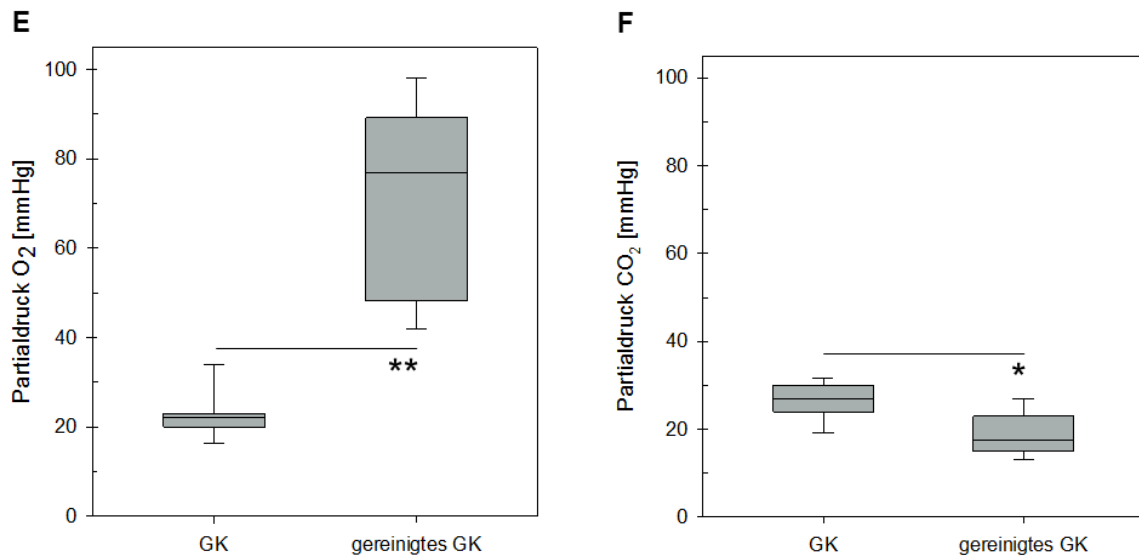
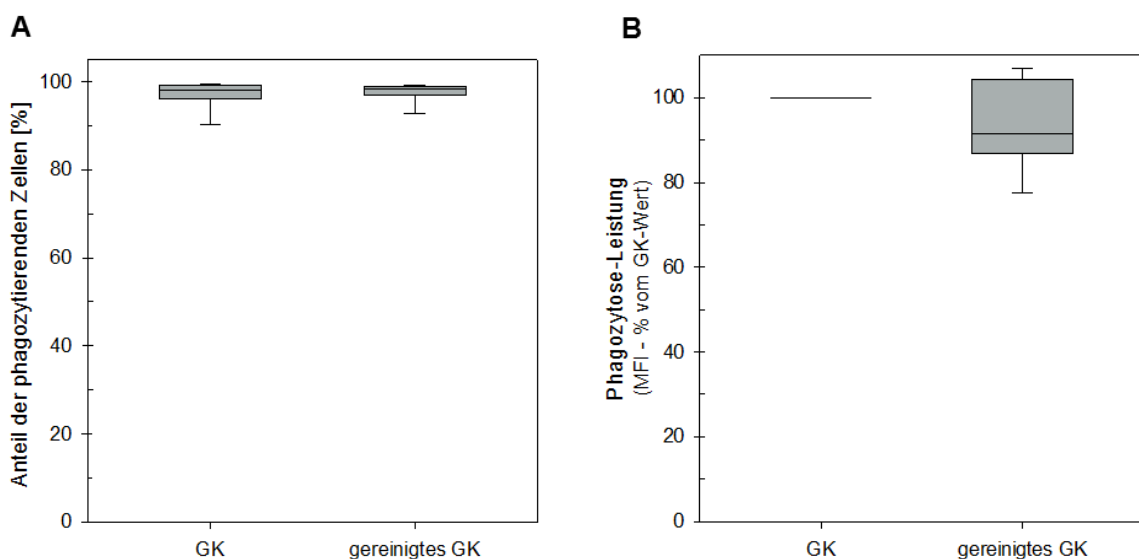


Abb. 22 (A) Glukose-, (B) Laktat-, (C) LDH-Konzentration, (D) pH-Wert und (E, F) Partialdrücke der Blutgase der Granulozytenkonzentrate vor und nach der Aufreinigung im geschlossenen System (n = 16; *p<0,05 und **p<0,001 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

4.2.3.3 Vergleich der Funktionsparameter der Granulozytenkonzentrate

Durch die Aufreinigung im geschlossenen System wurde sowohl der Anteil der phagozytierenden als auch der Oxyburst-aktiven Monozyten und Granulozyten nicht beeinflusst und blieb stabil. Während im Standard-Granulozytenkonzentrat 98,0 % der Zellen phagozytierten, wurden im gereinigten GK ein Anteil von 98,3 % gemessen (Abb. 23A). Der Anteil der oxidierenden Monozyten und Granulozyten verhielt sich identisch und lag bei 99,8 % vor und bei 99,6 % nach der Prozessierung (Abb. 23C). Veränderungen konnten lediglich bei den Leistungsparametern nachgewiesen werden. So verringerte sich die Phagozytose-Leistung bezogen auf das Standard-GK um 8,5 % auf 91,5 % (Abb. 23B). Die Oxyburst-Leistung stieg durch den Aufreinigungsprozess signifikant an. So wurde die Produktion von Sauerstoffradikalen bezogen zum Granulozytenkonzentrat um 58,7 % gesteigert (Abb. 23D).



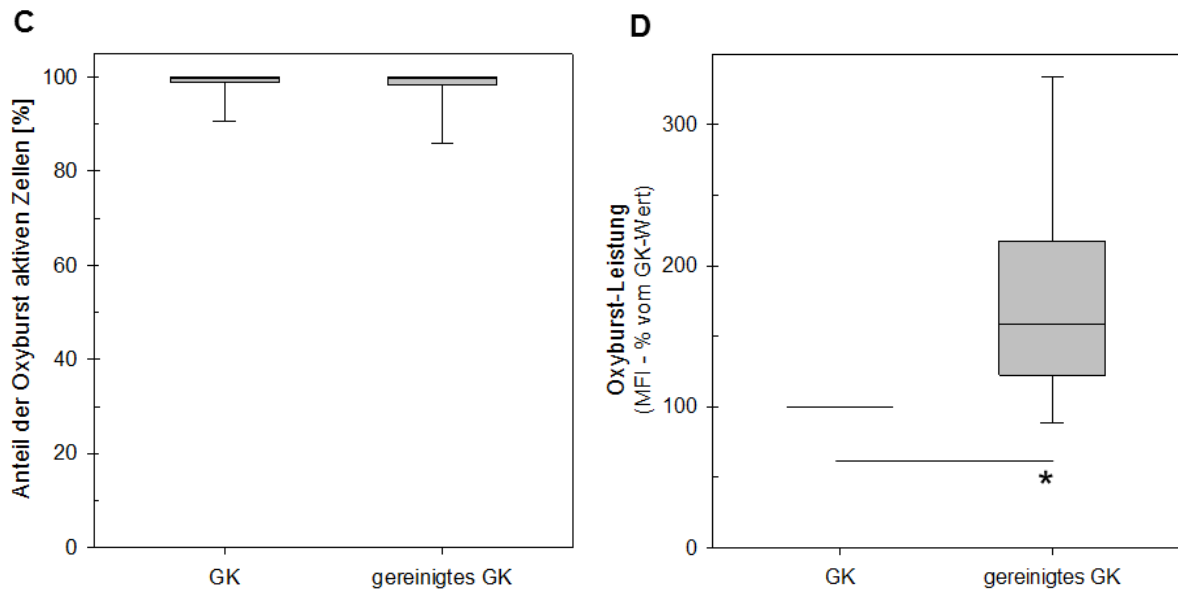


Abb. 23 (A) Prozentualer Anteil an phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen aufs GK (100 %); (C) Prozentualer Anteil an Oxyburst-aktiven Granulozyten und (D) deren Oxyburst-Leistung bezogen aufs GK (100 %) nach Aufreinigung im geschlossenen System (n = 16; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Für die bessere Visualisierung der Phagozytose wurden mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von Granulozyten aus dem Standard-Konzentrat und nach der Aufreinigung gemacht (Vgl. 3.4.3). Gut zu erkennen sind dabei die mehrfach segmentierten Zellkerne (blau), die durch das Aktinfilament des Zytoskeletts (rot) umschlossen sind. Es wird auf beiden Aufnahmen (Abb. 24A und B) deutlich sichtbar, dass sich die grün fluoreszierenden *E.coli* sowohl vor als auch nach dem Aufreinigungsprozess im intrazellulären Raum zwischen Zellkern und Zytoskelett befinden und somit von den Granulozyten phagozytiert wurden.

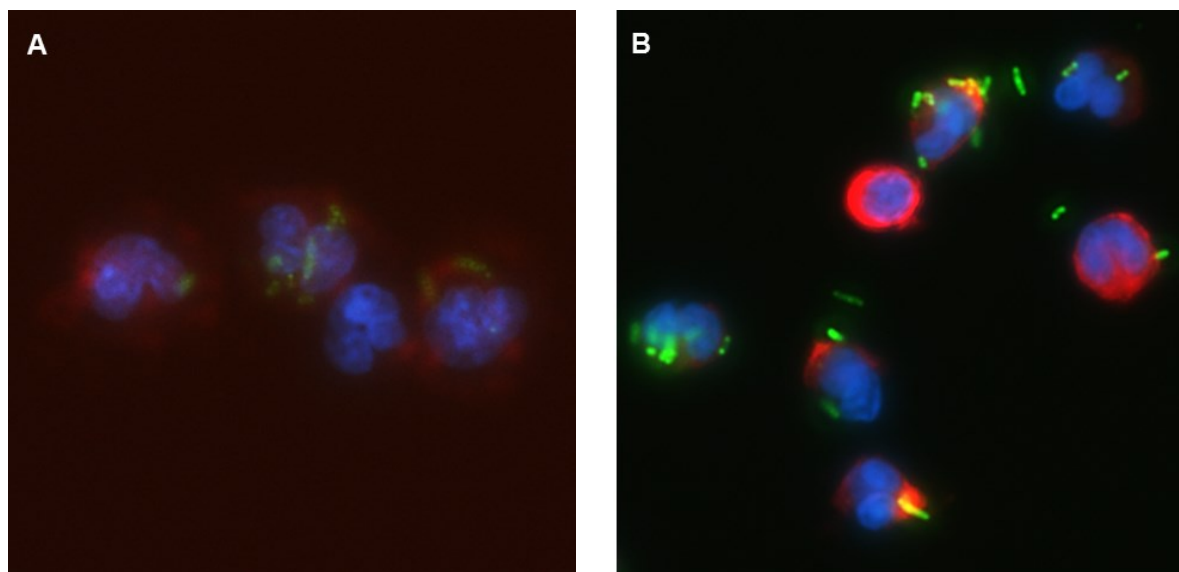


Abb. 24 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (400x) von phagozytierenden Granulozyten aus dem (A) Standard-Granulozytenkonzentrat (GK) bzw. (B) gereinigten Granulozytenkonzentrat (blau = Zellkern, rot = Zytoskelett/ Aktinfilament, grün = *E.coli*)

4.2.3.4 Vergleich der Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD64 und CD89 der Granulozytenkonzentraten

Auch der prozentuale Anteil der Granulozyten und Monozyten, die die Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD35, CD64 und CD89 exprimieren, wurde von dem Aufreinigungsprozess nur minimal und nicht signifikant beeinflusst. So lag der Zellanteil bei CD11b, CD16 und CD89 bei stabil um die 99 %, 84 % und 98 %. Der Zellanteil der CD11c, CD14, CD35 und CD64 auf seiner Oberfläche abbildete, nahm hingegen leicht ab. Auffällig war, dass nur ein geringer Prozentsatz an Granulozyten CD18 exprimierte. Bei den Oberflächenmolekülen CD11b, CD11c, CD14 und CD64 stieg die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), die ein Maß für die Menge der exprimierten Marker ist, zwischen 2,1 % und 12,9 % an. Die Menge an CD16, CD18, CD35 und CD89 nahm durch die Aufreinigung leicht ab.

In Tab. 9 findet sich eine Zusammenfassung der prozentualen Anteile der exprimierenden Monozyten und Granulozyten vor und nach der Aufreinigung und die mittlere Fluoreszenzintensität bezogen auf 100 % des GKs.

Tab. 9 Zusammenfassung des prozentualen Anteils der exprimierenden Monozyten und Granulozyten und der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bezogen auf 100 % MFI des GK vor und nach der Aufreinigung im geschlossenen System (n = 1)

Oberflächenmolekül	GK	gereinigtes GK	
	Anteil der Zellen [%]	Anteil der Zellen [%]	MFI (% vom GK)
CD11b	99,5	99,5	103,5
CD11c	51,0	44,5	112,9
CD14	12,3	11,7	102,1
CD16	83,9	84,2	88,1
CD18	0,1	0,1	82,3
CD35	41,0	30,5	96,8
CD64	25,9	17,7	106,0
CD89	97,5	99,5	97,4

4.2.3.5 Vergleich der Sekretion der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ und TNF- α in den Granulozytenkonzentraten

Bei der Analyse der Plasmakonzentrationen der ausgewählten Zytokine im Standard- und im gereinigten Granulozytenkonzentrat, die in Tab. 11 im Anhang zusammengefasst sind, wurden unterschiedliche Veränderungen sichtbar, die aber nicht signifikant ausfielen. So blieb die Plasmakonzentration von IL-6 und INF- γ nach der Aufreinigung konstant. Bei IL-1 β kam es zu einer minimalen Reduktion des Plasmagehalts. Eine deutliche Konzentrationsabnahme wurde bei IL-8 festgestellt. Von anfänglichen 35,0 (29,5) pg/ml des Chemokins, konnte nach der Aufreinigung nichts mehr nachgewiesen werden, was bedeutet, dass der Plasmagehalt unter 4,4 pg/ml (Nachweisgrenze des ELISA) liegen musste. Ähnlich verhielt es sich mit dem Zytokin IL-10. Hier musste die Plasmakonzentration in beiden Granulozytenkonzentraten unter 2 pg/ml liegen, da mit dem verwendeten Testkit nicht nachgewiesen werden konnte. Die einzige Zunahme wurde bei TNF- α verzeichnet. Dort kam es nach der Aufreinigung zu einer annähernden Verdopplung der Plasmakonzentration von 15,8 (8,0) pg/ml auf 29,7 (8,5) pg/ml.

4.2.3.6 Blutausstriche und elektronenmikroskopische Aufnahmen der Granulozytenkonzentrate

Beim Vergleich der mikroskopischen Aufnahmen der Blutausstriche (Abb. 25A und B) wird die sehr gute Abreicherung der Erythrozyten und Thrombozyten durch die Aufreinigung deutlich sichtbar. So sind in Abb. 25B nur noch ein minimaler Anteil der roten Blutkörperchen und vereinzelt Blutplättchen zu finden. Morphologische Veränderungen der Leukozyten, die durch Stress während des Prozesses entstanden sein könnten, sind nicht erkennbar. Auch die detaillierteren raster- (Abb. 25 C und D) bzw. transmissionselektronenmikroskopischen (Abb. 25E und F) Aufnahmen zeigen keine Veränderungen der Granulozyten und bestätigen somit die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Aufnahmen.

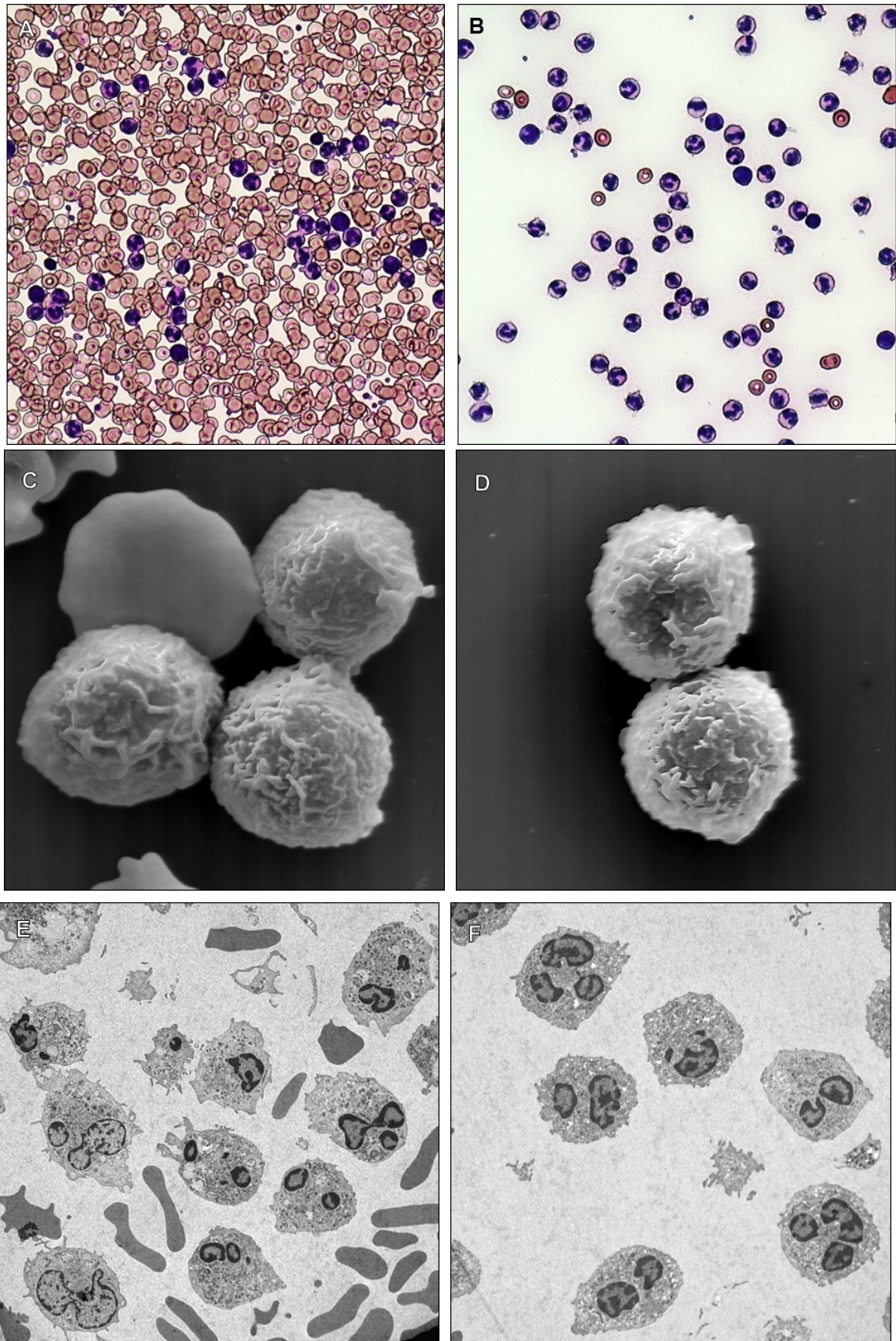


Abb. 25 (A) Lichtmikroskopische (400x), (C) rasterelektronenmikroskopische (6750x) und (E) transmissionselektronenmikroskopische (900x) Aufnahme eines Standard-Granulozyten-konzentrates; (B) Lichtmikroskopische (400x), (D) rasterelektronenmikroskopische (6750x) und (F) transmissionselektronenmikroskopische (900x) Aufnahme eines gereinigten Granulozyten-konzentrates

4.3 Entwicklung der Lagerungsbedingungen für gereinigte Granulozytenkonzentrate

Bei der Entwicklung der Lagerungsbedingungen für gereinigte Granulozytenkonzentrate wurden sowohl durch Regularien festgelegte Bedingungen für Standard-GKs, wie Temperatur und Bewegung, als auch bislang nicht berücksichtigte und nicht genauer definierte Parameter, wie Zellkonzentration, Lagerungsbeutel und Lagerungsmedium, in vergleichenden Experimenten untersucht. Die in einer Versuchsreihe gewonnenen Erkenntnisse über die optimalen Lagerungsbedingungen wurden in die folgenden Versuchsanordnungen übernommen. Abb. 26 veranschaulicht die experimentelle Abfolge der untersuchten Parameter. Für weitere Experimentdetails siehe Kapitel „Material und Methoden“ (3.6).

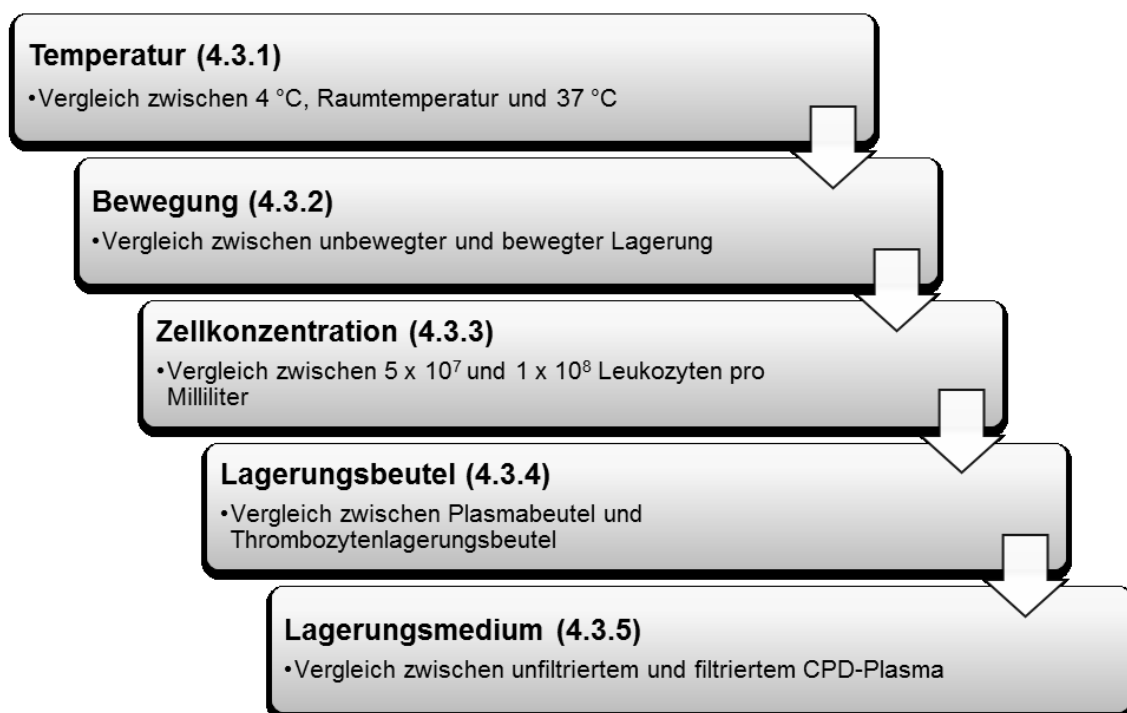


Abb. 26 Schematische Darstellung der Entwicklung der Lagerungsbedingungen für gereinigte Granulozytenkonzentrate

Grundsätzliches Ziel der getesteten und anschließend verwendeten Lagerungsbedingungen war es, dass sie in einer transfusionsmedizinischen Einrichtung umsetzbar und die gelagerten Leukozyten in der Humanmedizin anwendbar sind.

4.3.1 Vergleich unterschiedlicher Lagerungstemperaturen

Laut Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen [23] sollen Standard-Granulozytenkonzentrate bei Raumtemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) gelagert werden. Somit wurden in diesem Entwicklungsschritt die zu testenden Temperaturen mit 4°C , Raumtemperatur und 37°C so gewählt, dass sie sowohl den Standard zum Vergleich als auch, mit einfachen Geräten (Kühlschrank, Inkubator, etc.), realisierbare Werte einschließen.

Vergleicht man die Zellzahlen der Leukozyten (Abb. 27A) über einen Zeitraum von 72 Stunden konnten nur geringfügige, nicht signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Temperaturen festgestellt werden. Nach 24h Stunden waren die Zellzahlen annähernd stabil geblieben, lediglich die bei 4°C gelagerten Testansätze wiesen einen minimalen Zellverlust auf 94,4 (17,3) % auf. Nach 48 Stunden hatte sich die Gesamtzellzahl der Leukozyten bei allen Temperaturen deutlich verringert. So wurden bei 4°C nur noch 42,8 (49,3) % und bei 37°C nur noch 50,7 (50,3) % der ursprünglichen Gesamtzellzahl wiedergefunden. Bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben fiel der Zellverlust geringer aus. In diesem Testansatz wurden noch 77,3 (9,9) % des Ausgangswerts nachgewiesen. Eine weitere Verschlechterung der Gesamtzellzahl konnte nach 72 Stunden nicht beobachtet werden. So blieben die Werte bei allen drei getesteten Temperaturen annähernd stabil. Die Messwerte der Vitalität der Leukozyten (Abb. 27B) spiegelten den teilweise deutlichen Zellverlust nur bedingt wieder. So wurden nach 24 Stunden bei allen Testtemperaturen noch Vitalitätswerte von über 92 % gemessen. Nach 48 Stunden waren in den 4°C - und Raumtemperatur-Proben noch circa 85 % der Leukozyten vital. Der Prozentsatz lebender Zellen bei diesen Lagerungsvarianten sank bis zum Ende der Versuche auf rund 75 %. Bei den 37°C -Testansätzen wurde nach 48 Stunden hingegen noch eine Vitalität von 92,0 (12,2) % ermittelt, die nach 72 Stunden drastisch einbrach, so dass nur noch 60,0 (34,9) % vitale Leukozyten nachgewiesen werden konnten.

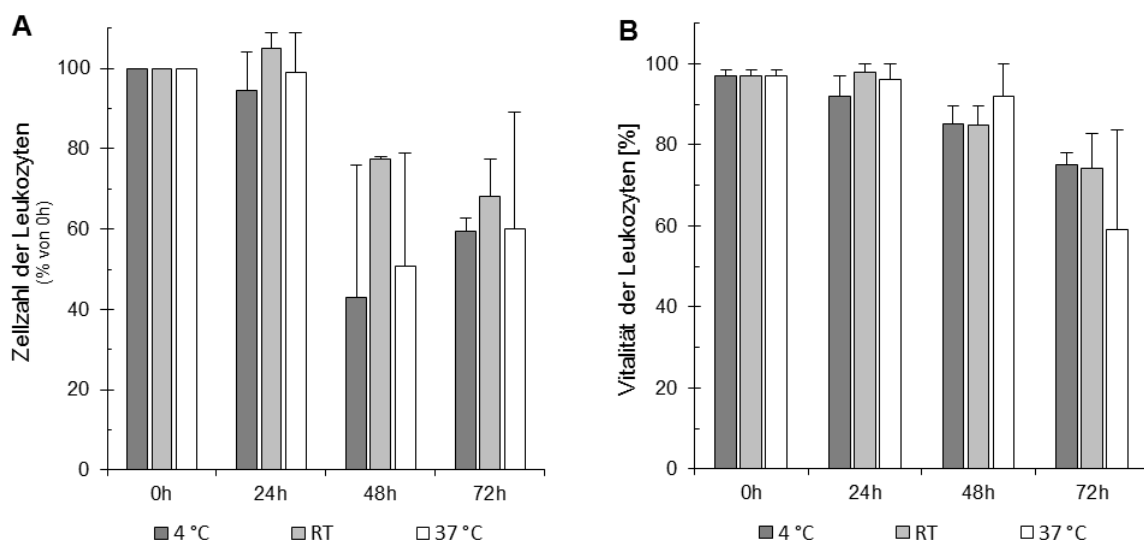


Abb. 27 (A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei 4°C , Raumtemperatur (RT) und 37°C über 72 Stunden ($n = 4$; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanz der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf als nicht signifikant getestet)

Betrachtet man den Anteil der Granulozyten, die die FITC-markierten *E.coli* phagozytiert haben (Abb. 28A), so konnten nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Testtemperaturen innerhalb des Lagerungszeitraums festgestellt werden. Erkennbar war dabei, dass der Prozentsatz an phagozytierenden Leukozyten bei den bei Raumtemperatur gelagerten Ansätzen über den gesamten Zeitraum stabil über 95 % lag und, im Vergleich zu den beiden anderen Lagerungstemperaturen, am höchsten ausfiel. Auch der Bestand an Phagozytose aktiven Zellen in den 4 °C gelagerten Proben blieb über die getesteten 72 Stunden stabil, fiel aber mit 93 bis 94 % geringer aus. Lediglich die bei 37 °C gelagerten Leukozyten wiesen einen Verlust an aktiven Zellen auf. So sank der Anteil an Phagozyten stetig von 98,4 (8,8) % (gGK) auf 88,7 (1,1) % (72h).

Der zeitliche Verlauf der Phagozytose-Leistung (Abb. 28B) ähnelte sich bei den Ansätzen, die bei 4 °C und Raumtemperatur gelagert wurden. Bis einschließlich 48 Stunden blieb die Phagozytose-Leistung stabil (99,6 (63,9) %) oder verzeichnete eine Leistungssteigerung auf 112,2 (33,9) % bezogen auf das Standard-GK. Innerhalb des Zeitraums zwischen 48 und 72 Stunden sank die Leistungskurve anschließend bis auf einen Wert von 89,5 (15,2) % bzw. 83,3 (2,3) % bezogen auf das GK. Bei den bei 37 °C gelagerten Granulozyten konnte ein ganz anderer Leistungsverlauf über den Zeitraum festgestellt werden. So zeigte sich nach 48 Stunden bereits ein Leistungsverlust von 25,0 %, der bis zum Messpunkt von 72 Stunden noch auf 42,6 % anstieg.

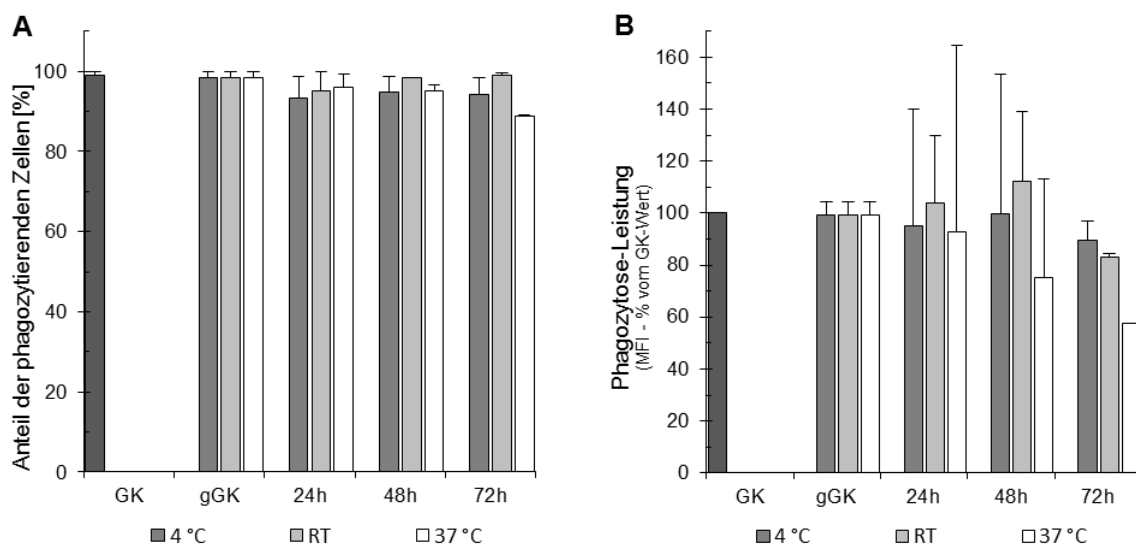


Abb. 28 (A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK (100 %) bei 4 °C, Raumtemperatur (RT) und 37 °C über 72 Stunden (n = 4; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; MFI = mean fluorescence intensity; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf als signifikant getestet)

Analysiert man die Messergebnisse des kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assays in Hinblick auf den Anteil der Oxyburst-aktiver Granulozyten und Monozyten (Abb. 29A), ließ sich feststellen, dass sich dieser über den Beobachtungszeitraum generell bei allen drei getesteten Temperaturen verringerte. Jedoch fiel dieser Verlust bei 4 °C deutlich stärker aus als bei den beiden wärmeren Temperaturen. Produzierten vor und nach der Aufreinigung noch 98,3 (2,3) % bzw. 97,1 (12,5) % der Zellen reaktive Sauerstoffspezies, sank der Anteil nach 24 Stunden auf 88,9 (26,2) %, nach

48 Stunden auf 59,5 (48,2) % und nach 72 Stunden auf 30,8 (8,7) % ab. Bei den bei Raumtemperatur gelagerten Ansätzen waren nach 24 Stunden noch 96,6 (21,9) % der Granulozyten noch in der Lage Oxyburst zu betreiben. Nach 48 und 72 Stunden konnten in diesen Lagerungsansätzen dann noch 89,9 (64,6) % bzw. 68,9 (55,5) % aktiver Zellen nachgewiesen werden. Die Resultate für die bei 37 °C gelagerten Proben wiesen einen aktiven Zellanteil von 96,3 (19,4) %, 91,0 (41,2) % und 51,2 (3,9) % zu den ausgewählten Messzeitpunkten auf.

Auch die Messergebnisse für die Oxyburst-Leistung der gelagerten Leukozyten (Abb. 29B) wiesen einen ähnlichen Verlauf wie der prozentuale Anteil der aktiven Zellen auf. Nach einer anfänglichen Leistungssteigerung auf durchschnittlich 128,1 (156,3) % ausgehend vom GK-Wert, reduzierte sich die Oxyburst-Leistung bis zum Ende des Beobachtungszeitraums bei allen Testtemperaturen auf Werte zwischen 18,4 (7,3) % (37 °C) und 54,9 (53,4) % (RT). Im Gegensatz zum aktiven Zellanteil zeigten sich bei der Oxyburst-Leistung Parallelen zwischen den 4 °C- und 37°C-Lagerungsansätzen. So reduzierte sich die Leistung dieser getesteten Leukozyten nach 48 Stunden auf rund 30 % und nach 72 Stunden auf circa 20 %. Die bei Raumtemperatur gelagerten Zellen wiesen einen signifikant geringeren Leistungsverlust auf. Nach 48 Stunden konnte noch eine Leistungsrate von 81,5 (51,5) % und nach 72 Stunden eine von 54,9 (53,4) % ermittelt werden.

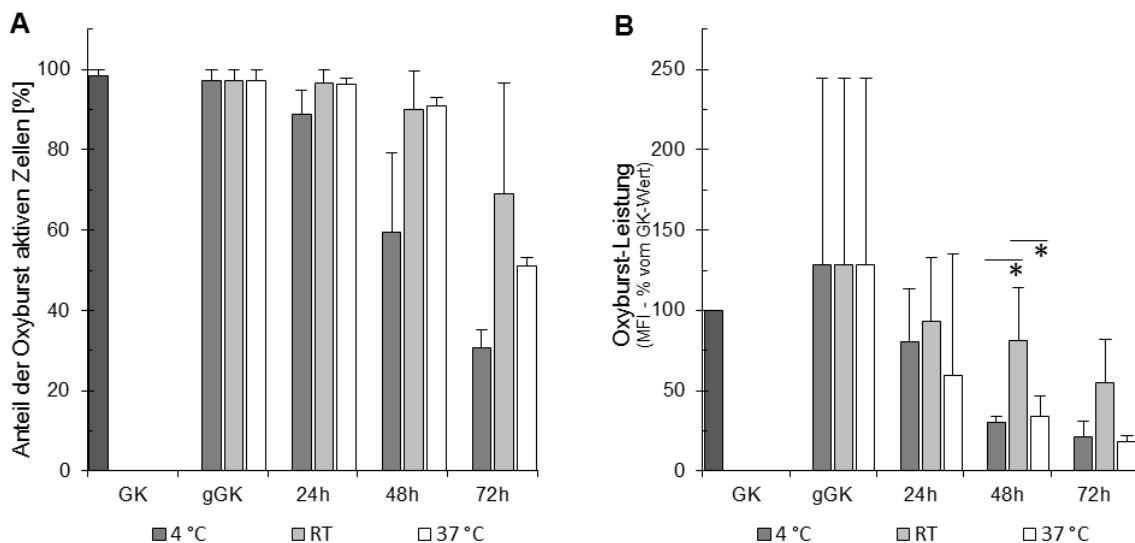


Abb. 29 (A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei 4 °C, Raumtemperatur (RT) und 37 °C über 72 Stunden (n = 4; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; MFI = der mean fluorescence intensity; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet ; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Eine weitere Möglichkeit die Oxyburst-Aktivität der gelagerten Leukozyten zu untersuchen, ist die Chemilumineszenz-Testung mit Luminol und Lucigenin. Dabei ist der mit Luminol durchgeführte Ansatz auf die intrazelluläre Ausschüttung von ROS ausgerichtet und lässt sich somit sehr gut mit der gemessenen Oxyburst-Leistung des kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assays vergleichen. Der Lucigenin basierte Untersuchungsteil hingegen zielt auf die Messung der extrazellulär freigesetzten Sauerstoffradikale.

Vergleicht man die Ergebnisse des Chemilumineszenz-Assays mit Luminol (Abb. 30A) mit den Ergebnissen für die Oxyburst-Leistung aus dem kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay, ließen sich parallele Verläufe erkennen. Durch die Aufreinigung kam es zu einer starken Leistungssteigerung der intrazellulären ROS-Freisetzung, die bei den bei Raumtemperatur gelagerten Leukozyten auch nach 24 Stunden noch nachweisbar war. Bei den beiden anderen Testansätzen reduzierte sich die Oxyburst-Leistung bereits innerhalb der ersten 24 Stunden leicht. Im weiteren Verlauf nahm die Leistungsintensität der Zellen bei allen getesteten Temperaturen kontinuierlich ab. Zu allen Messzeitpunkten und nach 72 Stunden zeigten die bei Raumtemperatur gelagerten Granulozyten die höchste Oxyburst-Aktivität (bezogen aufs GK).

Die Messergebnisse der extrazellulären Messung mittels Lucigenin (Abb. 30B) ergaben ein leicht anderes Verlaufsbild. So konnten zwar ebenfalls die starke Leistungssteigerung der Leukozyten durch die Aufreinigung und die nach 24 Stunden beginnende Minimierung nachgewiesen werden, aber bis einschließlich 72 Stunden wurde bei den bei 37 °C gelagerten Zellen die stärkste ROS-Freisetzung ins umgebende Milieu bestimmt.

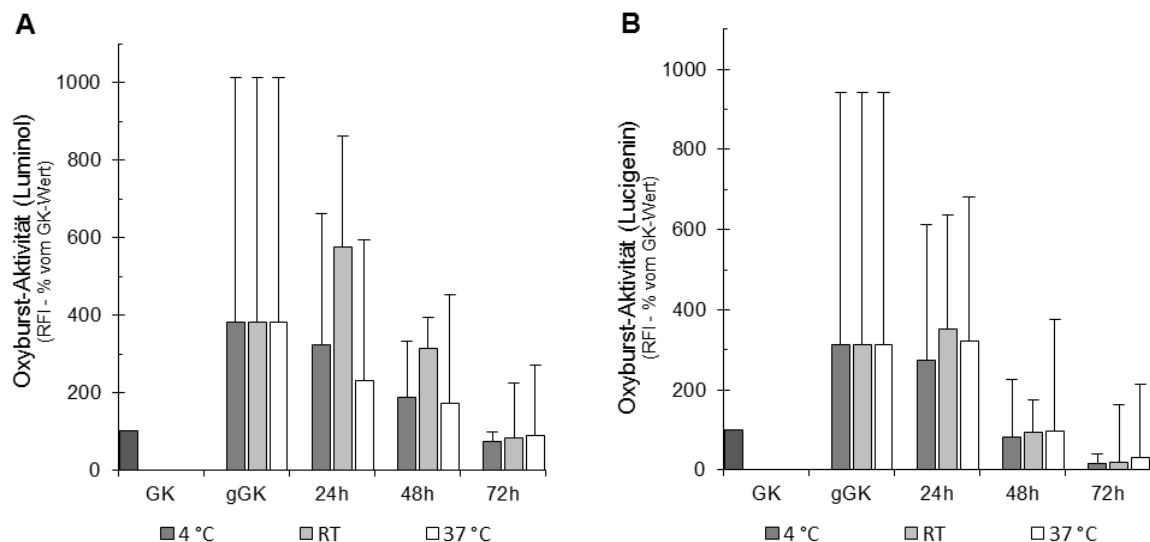


Abb. 30 Oxyburst-Aktivität der Granulozyten mittels Chemilumineszenz-Assay mit (A) Luminol und (B) Lucigenin bezogen auf das GK bei 4 °C, Raumtemperatur (RT) und 37 °C über 72 Stunden (n = 4; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite der relative fluorescence intensity (RFI); Signifikanz der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf als nicht signifikant getestet)

4.3.2 Vergleich der Lagerung mit und ohne Bewegung

Neben der Temperatur von 22 ± 2 °C (Raumtemperatur) enthalten die Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen [23] noch Vorgaben für die Bewegung von Standard-Granulozytenkonzentraten während der Lagerung. So sollen diese unbewegt gelagert werden. In diesem Entwicklungsabschnitt der Lagerung wurde deshalb getestet, ob eine kontinuierlich kreisende Bewegung mit einer Drehzahl von 170 min^{-1} einen Effekt auf die aufgereinigten Granulozytenkonzentrate im Vergleich zur unbewegten Lagerung hat.

Eine erste Auffälligkeit wurde bereits nach der äußerlichen Begutachtung der Lagerungsansätze festgestellt. Durch die Bewegung während der Lagerung setzten sich die Leukozyten verstärkt an den Spritzenports der Lagerungsbeutel ab (Abb. 31B). Bei der unbewegten Lagerung wurden diese konzentrierten Zellansammlungen nicht festgestellt. Die Leukozyten verteilten sich dabei gleichmäßig über die gesamte untere Beutelfläche (Abb. 31A). Diese Beobachtungen wurden gleichermaßen nach 24, 48 und 72 Stunden gemacht.

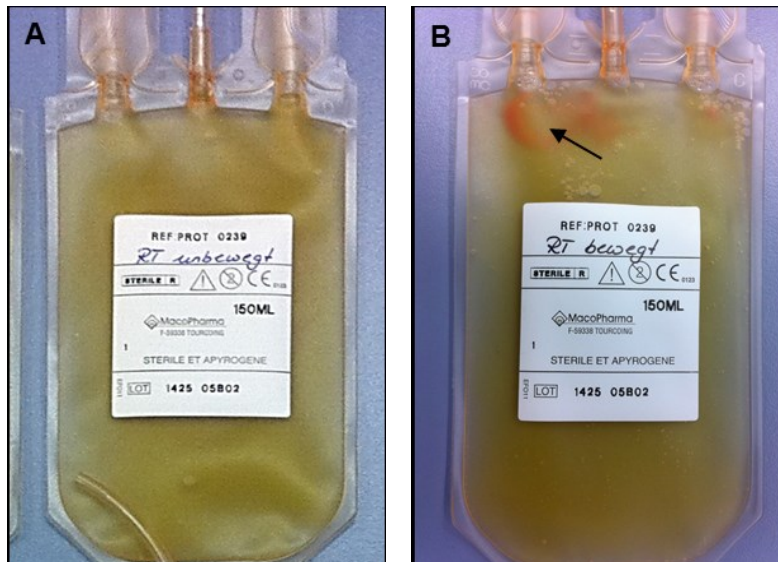


Abb. 31 Plasmabeutel mit gereinigtem Granulozytenkonzentrat nach Lagerung (A) ohne Bewegung und (B) mit Bewegung. Der Pfeil markiert die sich abgelagerten Leukozyten.

Bei der näheren Betrachtung der Zellzahlen der Leukozyten (Abb. 32A) konnte, unabhängig von der Bewegung, ein signifikanter Verlust an Zellen, bezogen auf den Ausgangswert (0h), über den gesamten Lagerungszeitraum festgestellt werden. Der beobachtete Zellverlust trat bei beiden Lagerungsvarianten unabhängig von der Bewegung auf, schien aber bei der bewegten Lagerung etwas deutlicher ausgeprägt zu sein. So sank die Gesamtzellzahl an Leukozyten über 72 Stunden kontinuierlich bei der unbewegten Lagerung auf einen prozentualen Anteil von 67,6 (23,5) % und bei der bewegten Lagerung auf 48,7 (32,8) % des Ausgangswerts.

Die Vitalität der Leukozyten (Abb. 32B) wies, unabhängig von der Lagerungsvariante, ebenfalls eine kontinuierliche, signifikant ausgeprägte Abnahme auf, die somit die Messwerte der Zellzahlen bestätigte. Auch der leicht negative Einfluss der bewegten Lagerung konnte festgestellt werden, auch wenn der Effekt noch geringer ausfiel. Bei der unbewegten Lagerung fiel die Vitalität nach 24 Stunden von 99,2 (1,7) % auf 97,7 (6,6) % und nach 48 Stunden auf 91,1 (17,1) %. Bei der bewegten Lagerung war der Anteil lebender Zellen nach den beiden Beobachtungszeitpunkten mit 96,3 (13,1) % und 92,1 (23,1) % minimal verändert. Nach 72 Stunden hatten sich die Vitalitätswerte beider Lagerungsvarianten annähernd angeglichen und lagen bei 92,7 (38,1) % und 93,2 (37,7) %.

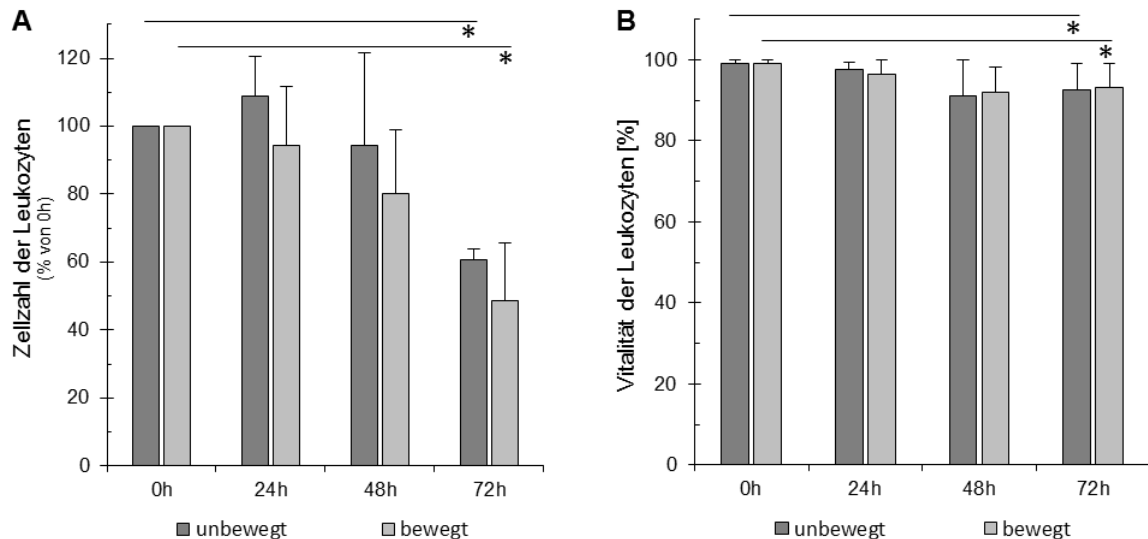


Abb. 32 (A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden (n = 9; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p < 0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Bei den getesteten Lagerungsvarianten stiegen die gemessenen LDH-Konzentrationen (Abb. 33) über den gesamten Beobachtungszeitraum leicht an. Die Messwerte korrelierten somit indirekt mit den sinkenden Zellzahlen und der verschlechterten Vitalität. So wurde bei der unbewegten Lagerung nach 72 Stunden eine LDH-Konzentration von 141 (13) U/l gemessen. Bei der bewegten Lagerung lag der Median bei 149 (15) U/l und somit nur minimal höher.

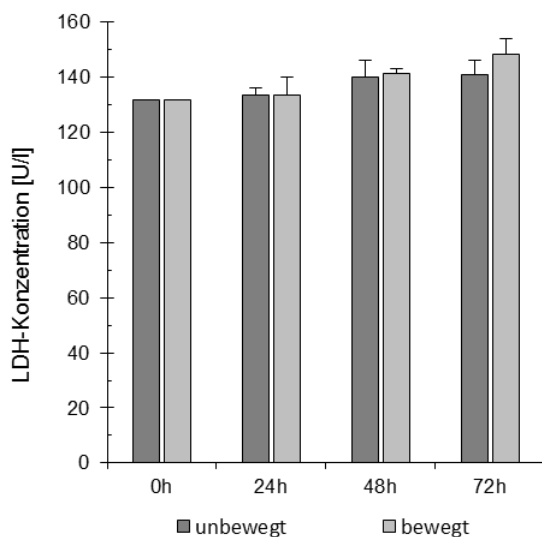


Abb. 33 LDH-Konzentration bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden (n = 6; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf als nicht signifikant getestet)

Bei der Analyse des zeitlichen Verlaufs der Glucosekonzentration (Abb. 34A) wurde bei beiden Lagerungsvarianten eine signifikante Abnahme über den Testzeitraum festgestellt. Vergleicht man die unbewegte und bewegte Lagerung zu den einzelnen Zeitpunkten untereinander, so fiel auf, dass die Abnahme des Glucosegehalts bei der bewegten Lagerung stärker ausfällt. Von der Ausgangskonzentration von 19,7 (0,7) mmol/l wurde nach 72 Stunden noch eine Konzentration von 18,4 (2,2) mmol/l bei der unbewegten Lagerung und bei der bewegten Lagerung von 18,2 (2,3) mmol/l gemessen. Dieser Abfall ist aber aus klinischer Sicht faktisch unbedeutend.

Die zu den gleichen Zeitpunkten gemessenen Laktatkonzentrationen (Abb. 34B) spiegeln indirekt die Messwerte der Glucosekonzentrationen wieder. Hier zeigte sich über die untersuchten 72 Stunden bei beiden Lagerungsvarianten ein signifikanter Anstieg der Laktatkonzentration. So stieg die Laktatkonzentration bei der unbewegten Lagerung im Median von 2,2 (0,2) mmol/l (0h) auf 5,7 (1,4) mmol/l (72h) und bei der bewegten Lagerung von ebenfalls 2,2 (0,2) mmol/l (0h) auf 5,3 (1,4) mmol/l (72h) an. Untereinander verglichen, stieg die Laktatkonzentration bei der unbewegten Lagerung somit etwas mehr an als bei der bewegten Lagerung, was auf einen erhöhten Verbrauch an Glucose auf Grund einer eventuell besseren Funktionalität zurückgeführt werden könnte.

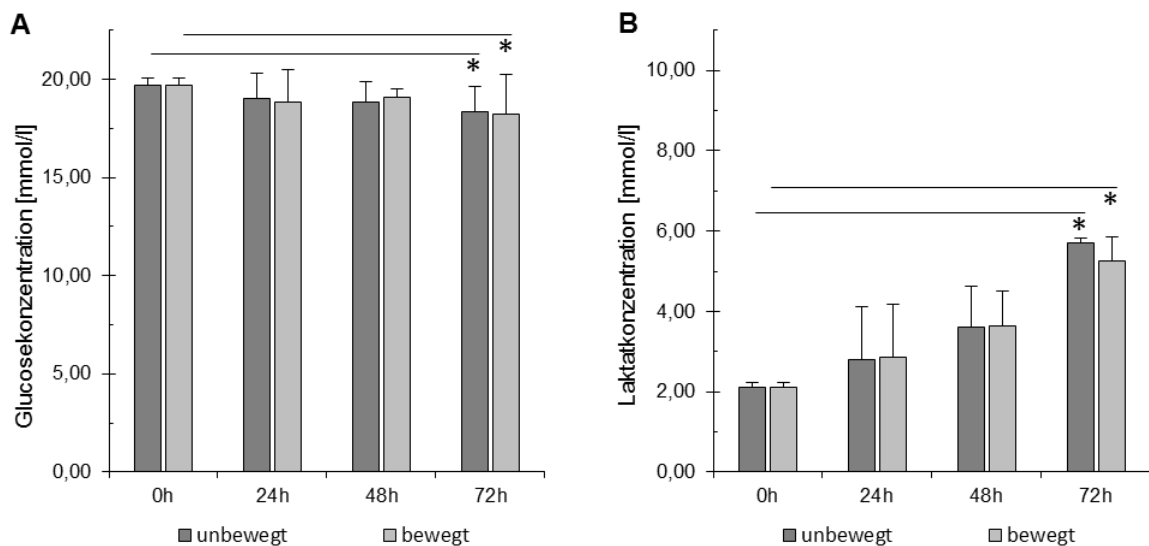


Abb. 34 (A) Glucose- und (B) Laktatkonzentration bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden (n = 9; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanz der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; * $p < 0,05$ bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Beim Anteil der phagozytierenden Granulozyten (Abb. 35A) ließen sich keine Unterschiede zwischen den Lagerungsvarianten erkennen. Der Anfangswert von 98,8 (9,1) % an aktiven Zellen im gGK blieb über den gesamten Zeitraum bei den zu vergleichenden Testansätzen stabil. So wurden bei der unbewegten Lagerung zu allen Beobachtungszeitpunkten mehr als 98 % phagozytierende Zellen durch die Messungen ermittelt. Die Messwerte für die bewegte Lagerungsvariante waren annähernd identisch.

Die Leistungskurve der phagozytierenden Granulozyten (Abb. 35B) wies hingegen leichte, nicht signifikante Unterschiede zwischen der unbewegten und der bewegten Lagerung auf. So schien die bewegte Lagerung für die Phagozytose-Leistung bis einschließlich 48 Stunden einen leicht positiven Effekt zu haben. Nach 72 Stunden sank die Phagozytose-Leistung dieses Lagerungsansatzes dann aber unter den Vergleichswert der unbewegten Lagerung. Einheitlich war hingegen bei beiden Lagerungsvarianten der kontinuierliche Leistungsverlust über den gesamten Beobachtungszeitraum. Bereits durch die Aufreinigung sank die Leistungsrate der Phagozytose beider Lagerungsansätze auf 85,1 (30,5) % vom GK-Ausgangswert. Nach 24 Stunden ging die Leistungsrate bereits auf rund 80 % zurück und reduzierte sich bis einschließlich 72 Stunden auf 69,9 (30,9) % bzw. 54,5 (38,9) % der anfänglichen Phagozytose-Leistung der Granulozyten.

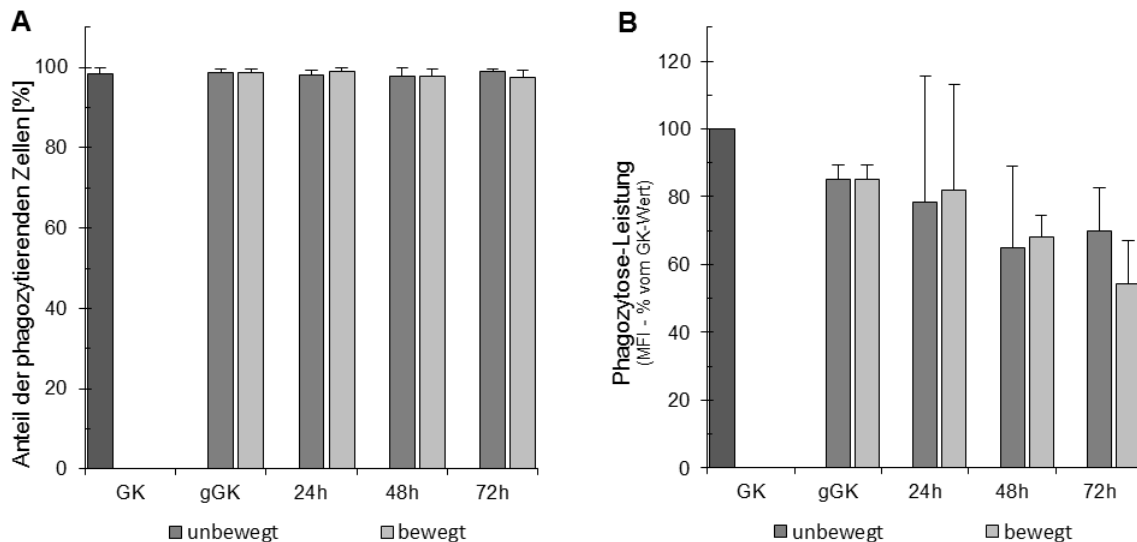


Abb. 35 (A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden (n = 6; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; MFI = mean fluorescence intensity; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf als nicht signifikant getestet)

Der in Abb. 36A dargestellte Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten beider Lagerungsvarianten wies bis 48 Stunden keinerlei Veränderungen auf und lag stabil bei annähernd 100,0 %. Dieser Prozentsatz konnte auch nach 72 Stunden noch bei der unbewegten Lagerung gemessen werden. Bei der bewegten Lagerung hingegen verringerte sich der aktive Zellanteil minimal auf 98,7 (22,7) %.

Die Oxyburst-Leistung bzw. Aktivität wurde sowohl mit dem kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay (Abb. 36B) als auch mittels Chemilumineszenz-Assay mit Luminol (Abb. 36C) und Lucigenin (Abb. 36D) ermittelt. Bezogen auf den Messwert des Standard-Granulozytenkonzentrates zeigten sich ähnliche Leistungskurven bei den unterschiedlichen Messungen. Bei allen drei Messvarianten kam es durch die Aufreinigung zu einer signifikanten Aktivierung und damit verbundenen Leistungssteigerung der Granulozyten sowohl bei der intrazellulären als auch bei der extrazellulären ROS-Produktion. Nach diesem anfänglichen Leistungsanstieg kam es im Verlauf der Lagerung dann zu einem signifikanten Rückgang gegenüber den Messwerten des gereinigten Granulozytenkonzentrates. Vergleicht man die Messwerte zu den unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten untereinander, wurden nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Lagerungsvarianten sichtbar. So schien es, dass zu den meisten Zeitpunkten die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch die unbewegt gelagerten Granulozyten etwas höher war als bei der bewegten Lagerung.

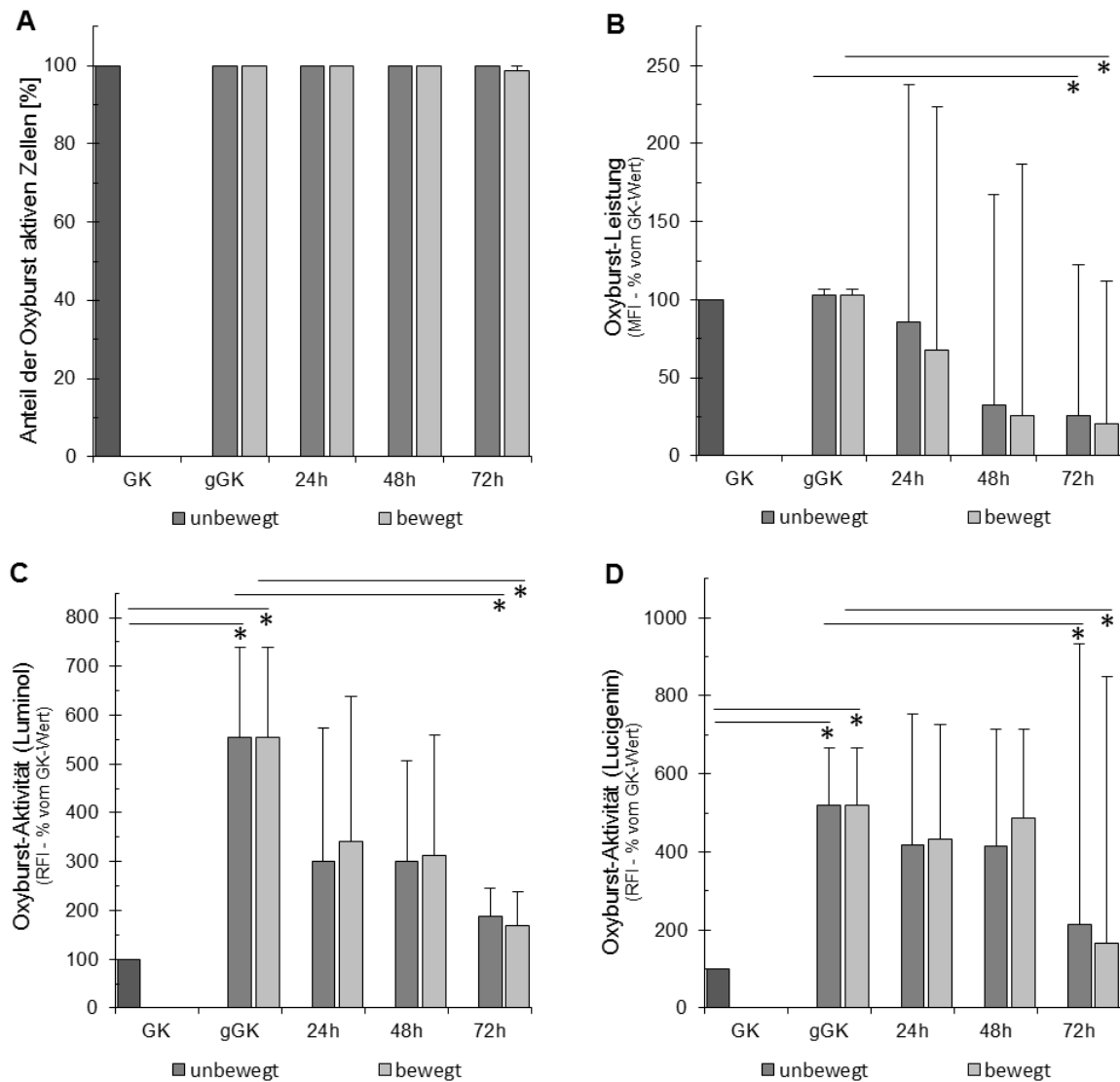


Abb. 36 (A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und deren Leistung/Aktivität mittels (B) kombiniertem Phagozytose-Oxyburst-Assay bzw. Chemilumineszenz-Assay mit (C) Luminol und (D) Lucigenin bezogen auf das GK bei unbewegter und bewegter Lagerung über 72 Stunden ($n = 9$; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; * $p < 0,05$ bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare; MFI = mean fluorescence intensity; RFI = relative fluorescence intensity)

4.3.3 Vergleich der Lagerung bei unterschiedlichen Leukozytenkonzentrationen

Da es durch die Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen keine Angaben zu einem geeigneten Bereich der Zellkonzentration während der Lagerung von Standard-Granulozyten gibt, wurden in dieser Entwicklungsphase eine niedrige Leukozytenkonzentration von $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (Gesamtzellzahl: 2×10^8) gegen eine hohe Konzentration von $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ (Gesamtzellzahl: 4×10^9) getestet.

Analysiert man die prozentual zum Nullstunden-Wert errechneten Zellzahlen (Abb. 37A) für die getesteten Konzentrationsvarianten, konnte in beiden Fällen ein signifikanter Zellverlust verzeichnet werden. Vergleicht man die Messwerte zu den einzelnen Zeitpunkten miteinander, wurden bereits nach 24 Stunden und wiederum nach 72 Stunden signifikante Unterschiede sichtbar. Konnten nach 48 Stunden im Lagerungsansatz mit niedriger Zellkonzentration im

Median noch 95,9 (49,0) % der Leukozytenausgangskonzentration gemessen werden, so wurden im Lagerungsansatz mit der hohen Konzentration nur noch 52,8 (51,0) % ermittelt. Die beiden Messwerte nahmen bis 72 Stunden weiterhin ab und lagen dann bei 59,8 (48,7) % (niedrige Zellkonzentration) bzw. 36,8 (18,7) % (hohe Zellkonzentration) des Nullwerts. Auch die Messergebnisse der Vitalität (Abb. 37B) wiesen ein vergleichbares Bild auf. Bei beiden Lagerungsvarianten nahm die Vitalitätsrate über den gesamten Beobachtungszeitraum ab. Auch zwischen den beiden Testansätzen zeigten sich nach 48 Stunden deutliche, aber nicht signifikante Unterschiede, die zu Gunsten der niedrigeren Leukozytenkonzentration ausfielen. So waren, im Gegensatz zur Lagerung mit einer hohen Zellzahl, nach 48 Stunden noch 90,8 (9,1) % der bei niedriger Zellzahl gelagerten Leukozyten vital. Auch nach 72 Stunden war die Vitalitätsrate des geringkonzentrierten Lagerungsansatzes mit 92,7 (31,3) % höher, als bei der hochkonzentrierten Lagerungsvariante (82,0 (13,0) %).

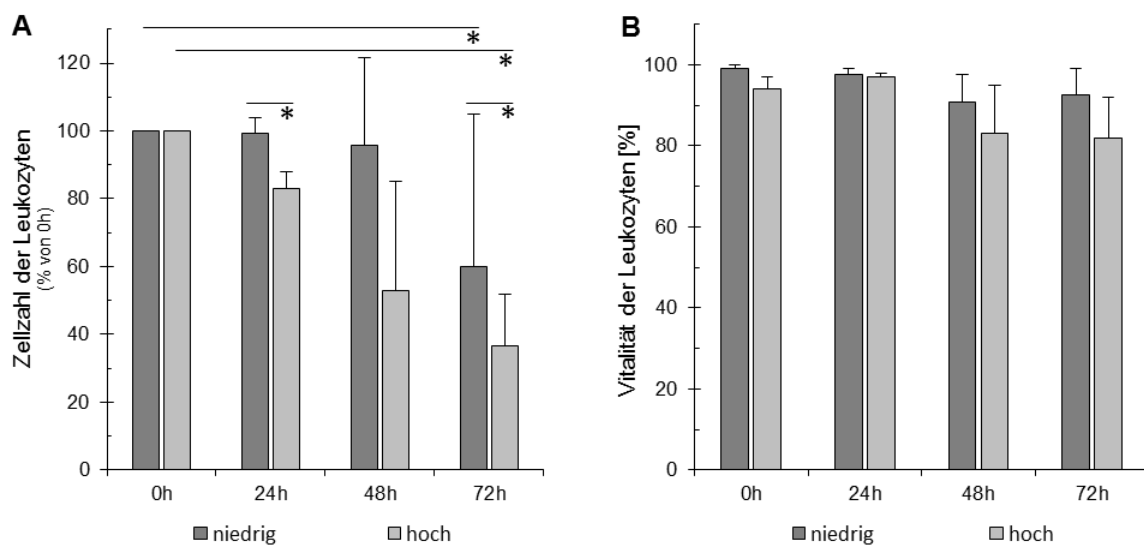


Abb. 37 (A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Durch die Bestimmung der LDH-Konzentration (Abb. 38) konnte der beobachtete Zellverlust während der Lagerung indirekt bestätigt werden. So wurde sowohl bei der Lagerung mit der niedrigen Zellkonzentration als auch bei der hohen Zellkonzentration ein Anstieg der LDH-Konzentration beobachtet, der bei der Lagerungsvariante mit hoher Gesamtzellzahl bereits nach 24 Stunden signifikant höher ausfiel und sich über den gesamten Testzeitraum fortsetzte. Nach 72 Stunden wurde im Lagerungsansatz mit der hohen Zellkonzentration mit 369 (129) U/l die 2,5-fache LDH-Konzentration der niedrig konzentrierten Lagerung (145 (9) U/l) gemessen.

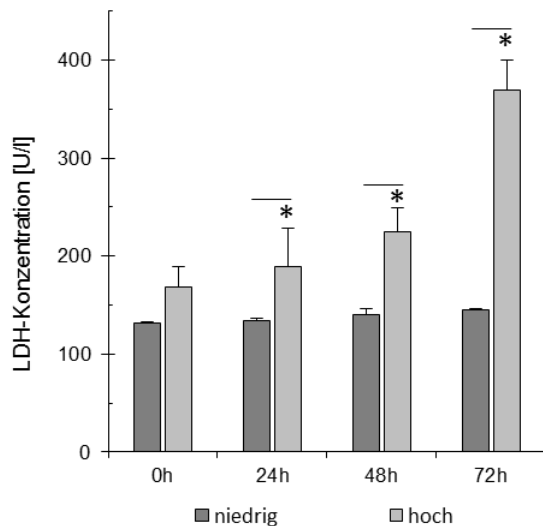


Abb. 38 LDH-Konzentration bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden ($n = 3$; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; * $p < 0,05$ bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Durch die unterschiedlichen Zellkonzentrationen während der Lagerung wurden die Partialdrücke der Blutgase (Abb. 39A und B) deutlich beeinflusst, so dass sich ab Zeitpunkt „24h“ signifikante Unterschiede zwischen den Lagerungsvarianten ergaben. Stieg der Sauerstoff-Partialdruck in den Lagerungsansätzen mit niedriger Zellkonzentration über die gesamten 72 Stunden nur leicht an, so wurde in der hochkonzentrierten Lagerungsvariante bis einschließlich 48 Stunden ein signifikanter Abfall des Sauerstoffpartialdrucks verzeichnet. Nach 72 Stunden stieg der Sauerstoffpartialdruck dann wieder leicht auf an. Die Messwerte des Kohlenstoffdioxid-Partialdrucks verliefen indirekt proportional zu den Ergebnissen des O_2 -Partialdrucks, das heißt je mehr der Partialdruck an O_2 absank, desto mehr stieg der CO_2 -Partialdruck an. Bis einschließlich 48 Stunden stieg der Partialdruck für CO_2 bei der Lagerung mit einer hohen Gesamtzellzahl auf 73 (20) mmHg an und ließ nach 72 Stunden dann wieder nach. Auch hier waren die Unterschiede zwischen den beiden Lagerungsarten signifikant. Bei der niedrig konzentrierten Lagerung nahm der Partialdruck für CO_2 seit Lagerungsbeginn sogar noch leicht ab.

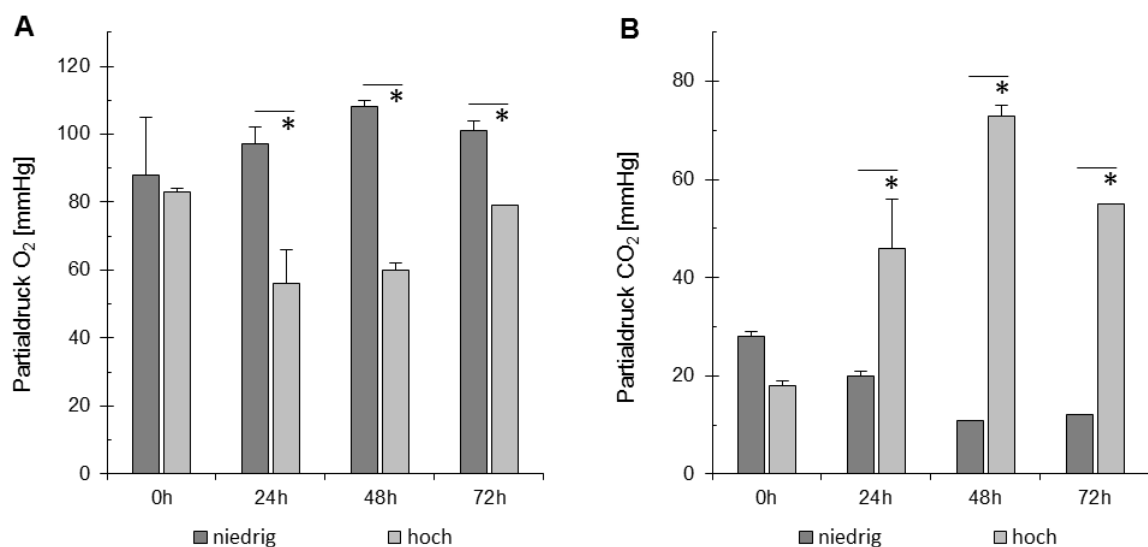


Abb. 39 Partialdrücke für (A) Sauerstoff und (B) Kohlenstoffdioxid bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden ($n = 3$; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; * $p < 0,05$ bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Trotz sinkender Zellzahlen und sich verschlechternder Vitalität wurden bei der Analyse des prozentualen Anteils der phagozytierenden Granulozyten (Abb. 40A) annähernd stabile Prozentsätze bei beiden Lagerungsvarianten ermittelt. So phagozytierten über den gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 96,4 (5,7) % und 99,4 (1,8) % der bei niedriger Zellkonzentration gelagerten Granulozyten. Beim Lagerungsansatz mit der hohen Gesamtzellzahl lag der Anteil der aktiven PMN bis einschließlich 48 Stunden in einem ähnlichen Bereich und verschlechterte sich nach 72 Stunden auf 89,2 (9,5) %.

Auch die Phagozytose-Leistung bezogen auf das Standard-GK ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lagerungsvarianten. So wurde bei dem Testansatz mit niedriger Zellkonzentration nach 24 Stunden eine Leistungssteigerung auf 115,5 (52,7) % festgestellt, die über den Zeitverlauf dann wieder abnahm. Bei der hochkonzentrierten Lagerungsvariante blieb dieser Effekt aus. Nach 72 Stunden konnten bei der niedrig konzentrierten Lagerungsvariante noch 69,9 (83,2) % und bei der Lagerung mit einer hohen Gesamtzellzahl noch 68,4 (31,6) % der Ausgangsleistung des GKs gemessen werden.

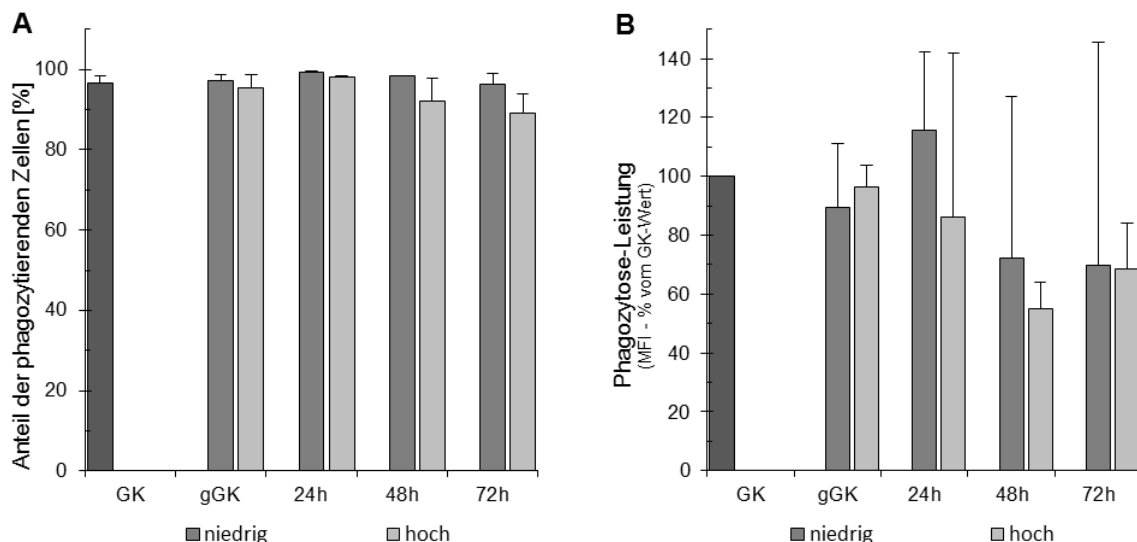


Abb. 40 (A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; MFI = mean fluorescence intensity; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf als nicht signifikant getestet)

Bei der Analyse des prozentualen Anteils der Oxyburst-aktiven Leukozyten (Abb. 41A) zeigten sich bis einschließlich 48 Stunden keine Veränderungen bei beiden Lagerungsvarianten. Nach 72 Stunden wurde eine minimale Verschlechterung des aktiven Zellanteils bei den hochkonzentrierten Lagerungsansätzen festgestellt. So lag der Prozentsatz am Ende des Beobachtungszeitraums bei 96,1 (7,5) %. Der Oxyburst-aktive Zellanteil bei der niedrigkonzentrierten Lagerung lag über die gesamten 72 Stunden stabil bei rund 100,0 %.

Bei der Untersuchung der Oxyburst-Leistung (Abb. 41B-D) zeigten sich zwischen den Messergebnissen des kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assays und des Chemilumineszenz-Assays mit Luminol Parallelen. Durch die Aufreinigung kam es zu einer Leistungssteigerung auf das Vier- bis Fünffache des GK-Messwerts. Dieser Effekt konnte auch nach 24 Stunden noch

nachgewiesen werden. Im weiteren Zeitverlauf der Lagerung kam es anschließend in beiden Varianten zu einem erkennbaren, aber nicht signifikanten Rückgang der Oxyburst-Leistung. Vergleicht man die beiden Lagerungsvarianten in diesem Entwicklungsschritt zu den einzelnen Zeitpunkten miteinander, wurden deutliche Unterschiede sichtbar, die bei der Chemilumineszenz-Messung mit Luminol sogar signifikant ausfielen. So war die Oxyburst-Aktivität der Leukozyten im hochkonzentrierten Lagerungsansatz zu den Zeitpunkten gGK, 24h und 48h stets höher als bei der niedrigeren Zellzahl. Nach 72 Stunden hatten sich die Werte der Leistung der intrazellulären ROS-Produktion zwischen den beiden getesteten Zellkonzentrationen annähernd ausgeglichen. Die extrazelluläre Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies hingegen ist bei der hochkonzentrierten Lagerung deutlich stärker ausgeprägt.

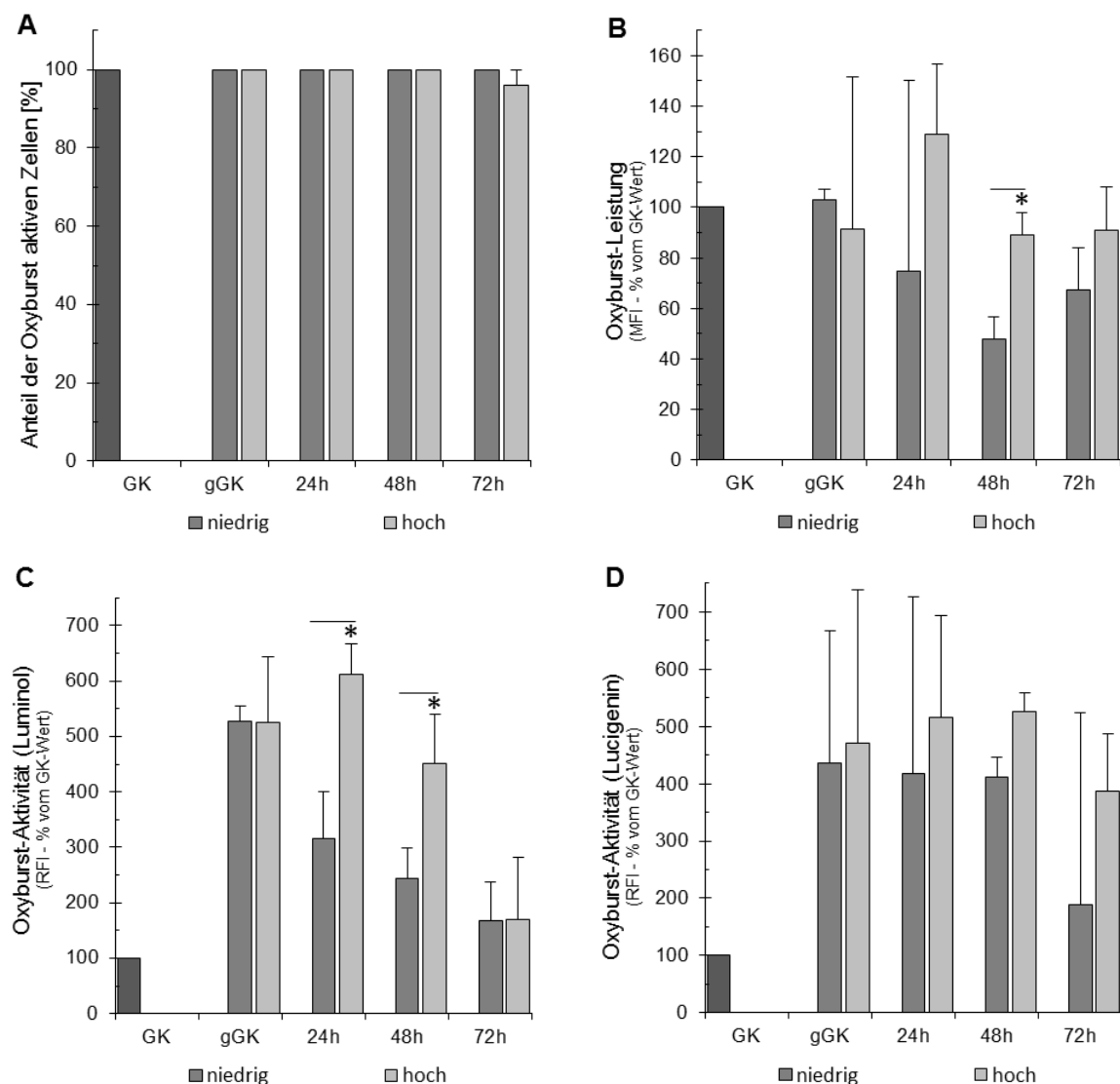


Abb. 41 (A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und deren Leistung/Aktivität mittels (B) kombiniertem Phagozytose-Oxyburst-Assay bzw. Chemilumineszenz-Assay mit (C) Luminol und (D) Lucigenin bezogen auf das GK bei der Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden ($n = 3$; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; * $p < 0,05$ bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare; MFI = mean fluorescence intensity; RFI = relative fluorescence intensity)

Auch auf den zeitlichen Verlauf der Glucose- (Abb. 42A) und Laktatkonzentration (Abb. 42B) hatten die verschiedenen Zellkonzentrationen bzw. Gesamtzellzahlen einen eindeutigen Einfluss. So wurde bei beiden Lagerungsvarianten eine Reduktion des Glucosegehalts mit gleichzeitiger Akkumulation von Laktat im Plasma beobachtet. Im Vergleich zur Lagerung mit niedriger Zellkonzentration verstoffwechselten die Leukozyten, die mit einer höheren Gesamtzellzahl gelagert wurden, bereits innerhalb der ersten 24 Stunden signifikant mehr Glucose und produzierten ebenfalls signifikant mehr Laktat, das im Plasma nachgewiesen werden konnte. Während die Glucosekonzentration von 18,0 (3,3) mmol/l auf 9,8 (4,1) mmol/l sank, stieg die Laktatkonzentration von anfänglichen 3,9 (3,0) mmol/l auf 19,2 (6,2) mmol/l. Dieser Verlaufstrend setzte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum fort. So wurden nach 72 Stunden in den hochkonzentrierten Lagerungsansätzen ein Restgehalt an Glucose von lediglich 3,6 (4,5) mmol/l und ein Laktatgehalt von 17,9 (2,4) mmol/l gemessen. In der Lagerungsvariante mit niedriger Zellkonzentration wurde am Ende des Testzeitraums mit 18,2 (1,6) mmol/l eine signifikant höhere Glucose- und mit 4,6 (1,4) mmol/l eine signifikant geringere Laktatkonzentration gemessen.

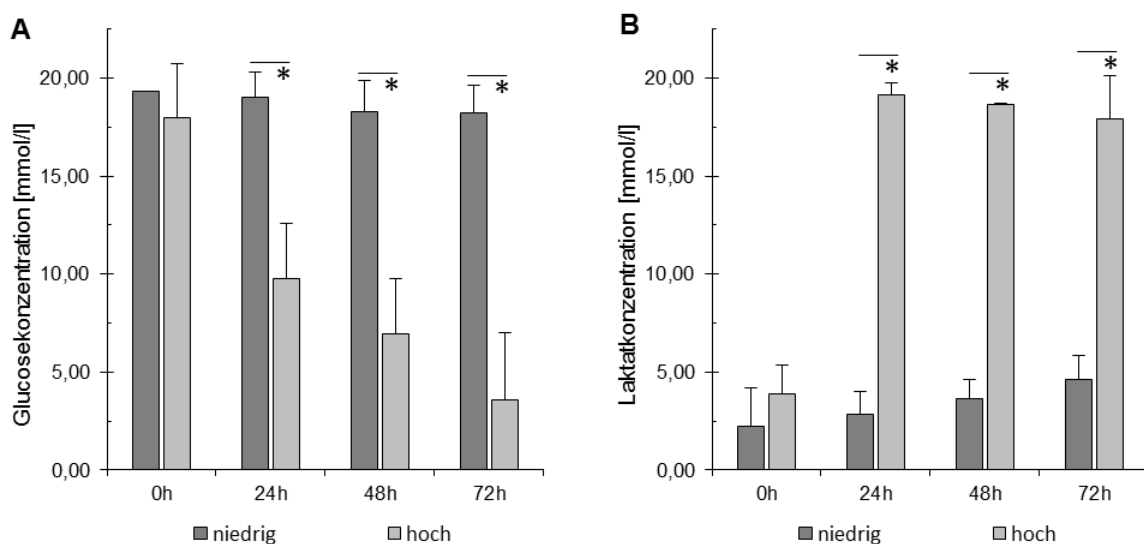


Abb. 42 (A) Glucose- und (B) Laktatkonzentration bei Lagerung mit niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Neben den Partialdrücken der Blutgase und den Plasmakonzentrationen an Glucose und Laktat, wurde auch der pH-Wert der Lagerungsansätze durch die unterschiedlichen Leukozytenkonzentrationen beeinflusst. Bei der Lagerungsvariante mit niedriger Zellkonzentration blieb der pH-Wert stabil und stieg nach 72 Stunden nur minimal von anfänglichen 7,44 (0,08) auf 7,50 (0,02) an. Bei der hoch konzentrierten Lagerung hingegen fiel der pH-Wert bereits nach 24 Stunden auf 6,80 (0,30) und sank im weiteren Verlauf der Lagerungszeit auf 6,60 (0,03) und letztendlich auf 6,39 (0,02) ab. Es konnte somit zu allen Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Lagerungsbedingungen festgestellt werden.

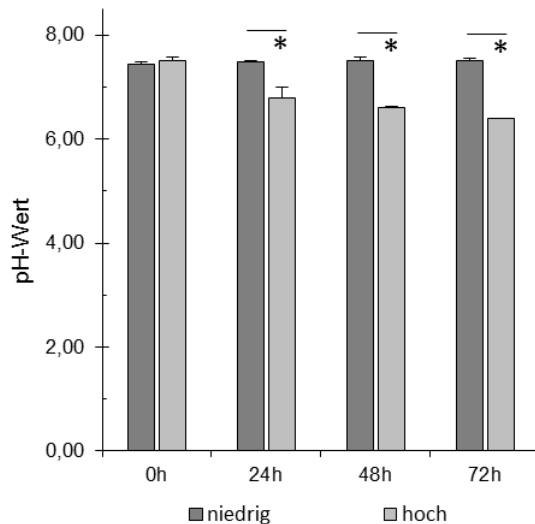


Abb. 43 pH-Wert der Lagerungsansätze bei niedriger bzw. hoher Zellkonzentration über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

4.3.4 Vergleich der Lagerung in unterschiedlichen Lagerungsbeuteln

Aufgrund der Ergebnisse für die Lagerung mit höheren Zellkonzentrationen und den damit verbundenen hohen Gesamtzellzahlen an Leukozyten ist bekannt, dass der pH-Wert und die Blutgase stark beeinflusst wurden und ein unphysiologisches Niveau erreichten. In diesem Entwicklungsschritt wurde daher untersucht, ob sich mit der Nutzung eines Thrombozytenlagerungsbeutels (höhere Gaspermeabilität) an Stelle der bisher verwendeten Plasmabeutel aus dem Vierfach-Set eine Verbesserung/Stabilität der physiologischen Bedingungen während der Lagerungsperiode erzielen ließe (Vgl. 3.6.4).

Schon bei der Analyse des ersten Parameters, der durch die eingesetzten hohen Gesamtzellzahlen stark beeinflusst wurde und somit zu verbessern wäre, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden getesteten Lagerungsbeuteln. Bei beiden Beuteltypen fiel der pH-Wert (Abb. 44) von anfangs 7,52 (0,07) bzw. 7,53 (0,16) über den gesamten Beobachtungszeitraum kontinuierlich ab. Dieser Umstand schien bei der Lagerung im Plasmabeutel jedoch signifikanter ausgeprägt zu sein, so dass nach 72 Stunden ein Wert von 6,39 (0,03) gemessen wurde. Im Vergleich dazu, wurde bei dem Lagerungsansatz im Thrombozytenbeutel lediglich ein pH-Wert von 7,01 (0,05) festgestellt. Damit fiel der pH-Wert zwar signifikant höher aus, lag aber ebenso außerhalb des physiologischen pH-Bereichs von Blutplasma (7,35 - 7,45).

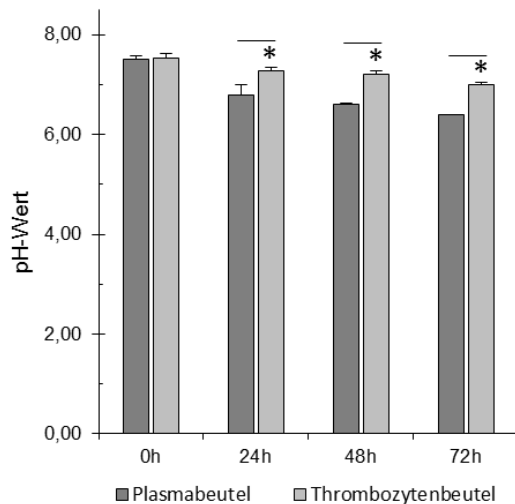


Abb. 44 pH-Wert der Leukozytensuspension, gelagert in Plasmabeuteln bzw. Thrombozytenlagerungs-beuteln über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Auch die beiden stark beeinflussten Partialdrücke der Blutgase wiesen durch die Nutzung des Thrombozytenlagerungsbeutels signifikante Verbesserungen auf. So sank bereits nach 24 Stunden der Sauerstoff-Partialdruck (Abb. 45A) bei der Leukozytenlagerung im Plasmabeutel auf einen unphysiologischen Wert von 56 (10) mmHg und blieb, trotz leichtem Anstieg, über den gesamten Beobachtungszeitraum auf diesem unphysiologischen. Bei der Lagerung im Thrombozytenbeutel hingegen wurde nach 24 Stunden ein physiologischer Sauerstoff-Partialdruck gemessen. Bis 72 Stunden blieb der Sauerstoff-Partialdruck annähernd stabil. Ein weiteres Problem der Lagerung in Plasmabeuteln war der Anstieg des Kohlenstoffdioxid-Partialdrucks (Abb. 45B), der bereits nach 24 Stunden mit 46 (13) mmHg ein unphysiologisches Niveau erreicht hatte. Auch innerhalb der nächsten 24 Stunden erhöhte sich der Wert, bevor er nach 72 zurückging. Durch den Einsatz der Thrombozytenlagerungsbeutel konnte die beobachtete CO₂-Anreicherung während der Lagerung signifikant gestoppt und der Partialdruck stabilisiert werden. Ausgehend von einem Wert von 17 (4) mmHg gab es nach 24 Stunden eine leichte Erhöhung, bevor nach 48 und 72 Stunden ein leichter Rückgang festgestellt wurde.

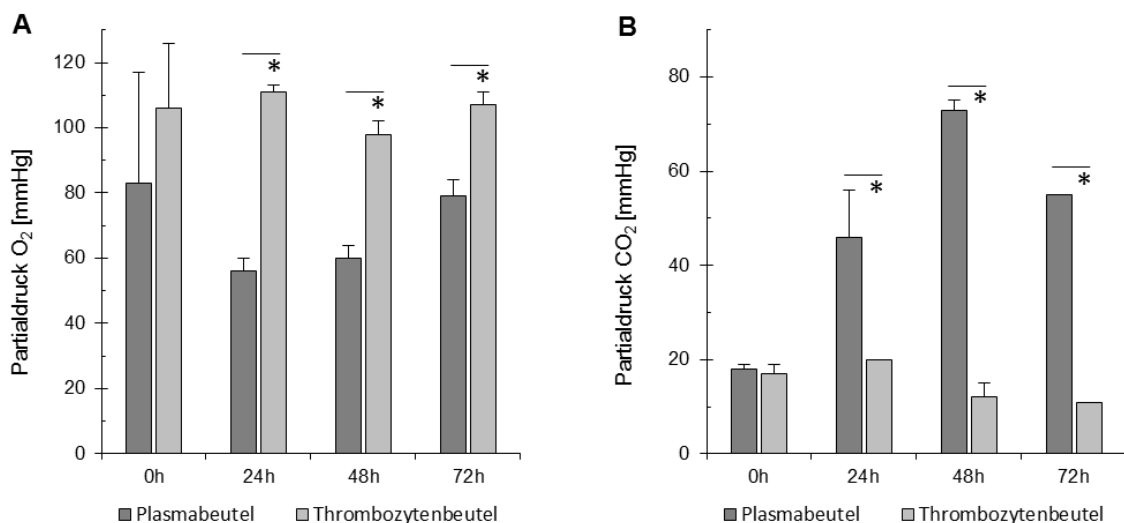


Abb. 45 Partialdrücke für (A) Sauerstoff und (B) Kohlenstoffdioxid bei der Lagerung in Plasmabeuteln bzw. Thrombozytenlagerungsbeuteln über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Auch bei der Analyse der Leukozytenzellzahlen über den gesamten Beobachtungszeitraum (Abb. 46A) wurden durch die Verwendung der Thrombozytenlagerungsbeutel deutliche Unterschiede festgestellt. Bei der Lagerung im Plasmabeutel wurde über die untersuchten 72 Stunden ein kontinuierlicher Rückgang der Gesamtzellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert ermittelt. So konnten am Ende des Testintervalls lediglich 36,8 (18,7) % der anfangs eingesetzten Leukozyten wiedergefunden werden. Bei der Lagerung im Thrombozytenbeutel zeigte sich hingegen ein ganz anderer Verlauf. Hier blieben die Zellzahlen annähernd stabil, so dass nach 72 Stunden noch 97,4 (20,3) % der anfänglichen Leukozyten gemessen wurden. Durch den Einsatz des Thrombozytenlagerungsbeutels kam es somit zu einer signifikanten Verbesserung des Zellzahlverlaufs über 72 Stunden. Auch die Vitalität der Leukozyten (Abb. 46B) wies Unterschiede zwischen den beiden Lagerungsbeuteln auf. Auch hier zeigte sich durch die Nutzung des Plasmabeutels während der Lagerung eine kontinuierliche Verschlechterung der Vitalität. Von einem Anfangswert von 94,0 (4,0) % waren nach 72 Stunden noch 79,0 (13,0) % vitale Leukozyten nachweisbar. Durch die Nutzung der Thrombozytenbeutel als Lagerungsgefäß kam es sogar zu einer Verbesserung der Vitalität über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die zu Beginn der Lagerung gemessenen 87,0 (6,0) % Vitalitätsrate stiegen auf einen Endwert von 93,0 (5,0) % an. Die errechneten Signifikanzen bei 0 Stunden und nach 24 Stunden sind auf unterschiedliche Ausgangswerte der Lagerungsansätze zurückzuführen und spiegeln nicht den Effekt der eingesetzten Lagerungsbeutel wieder. Grund für die voneinander abweichenden Zellkonzentrationen zum Zeitpunkt „0h“ ist die Herstellung der beiden Lagerungsansätze. Da unterschiedliche Lagerungsmedien verwendet wurden, konnten die Leukozyten nicht in einem Gesamtansatz resuspendiert und anschließend auf die Lagerungsbeutel aufgeteilt werden, sondern mussten jeder einzeln für sich eingestellt werden, so dass es zu Schwankungen in der Ausgangszellzahl gekommen ist.

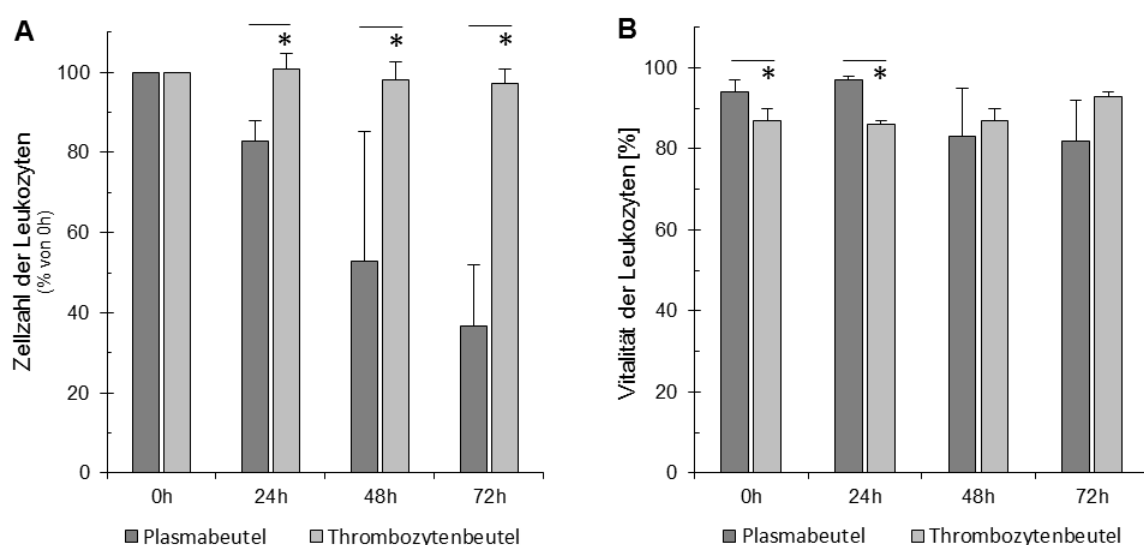


Abb. 46 (A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei der Lagerung im Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Die über den Testzeitraum erfassten Daten für die Konzentration von Laktatdehydrogenase (Abb. 47) in den Lagerungsansätzen untermauern die positiven Werte für die Leukozytenzellzahlen und die Vitalität. Obwohl bei beiden Beutelvarianten ein kontinuierlicher Anstieg über die 72 Stunden erkennbar war, fiel dieser bei der Lagerung im Thrombozytenbeutel deutlich geringer aus. Ausgehend von einem Anfangswert von 156 (95) U/l kam es nach 72 Stunden lediglich zu einer Erhöhung der LDH-Konzentration um 50 % auf 234 (177) U/l. Bei der Lagerung im Plasmabeutel wurde nach 72 Stunden im Plasma ein um 99,5 % höherer Wert als zu Beginn ermittelt. Dort stieg die LDH-Konzentration von 185 (42) U/l auf 369 (129) U/l an.

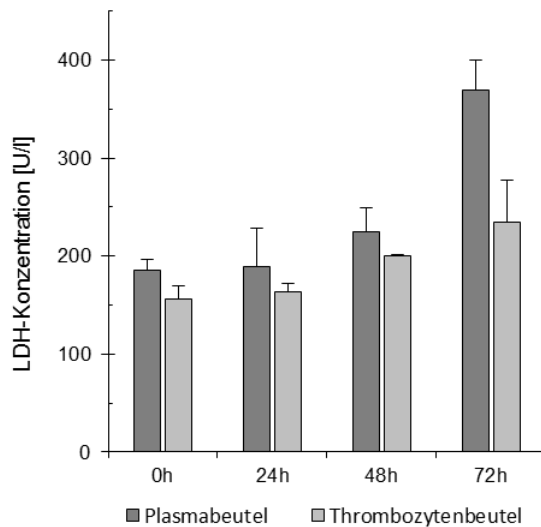


Abb. 47 LDH-Konzentration bei der Lagerung in Plasmabeuteln bzw. Thrombozytenlagerungsbeuteln über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf als nicht signifikant getestet)

Der prozentuale Anteil phagozytischer Granulozyten (Abb. 48A) wurde durch den Einsatz des Thrombozytenlagerungsbeutels nicht entscheidend beeinflusst. So lag der Prozentsatz aktiver Zellen bis einschließlich 48 Stunden bei beiden Lagerungsvarianten bei 92,2 (7,0) % und 97,0 (8,6) %. Erst nach 72 Stunden zeigte sich ein minimaler Unterschied. So konnten bei der Lagerung im Thrombozytenbeutel noch 95,3 (7,9) % der Leukozyten als aktiv phagozytierend charakterisiert werden, wohingegen dieser Anteil bei der Lagerung im Plasmabeutel auf 89,2 (9,5) % gesunken war. Betrachtet man aber die Phagozytose-Leistung (Abb. 48B) der beiden Lagerungsvarianten prozentual zum Ausgangs-GK konnte auch hier ein deutlicher Einfluss durch die Verwendung der Thrombozytenlagerungsbeutel festgestellt werden. Bei der Lagerung im Plasmabeutel wurde bereits nach 24 Stunden eine Reduktion der Aktivität festgestellt, die sich innerhalb der nächsten 24 Stunden weiter signifikant verschlechterte und auf 54,9 (11,1) % der Leistung des Standard-Granulozytenkonzentrates sank. Nach 72 Stunden wurde eine leichte Verbesserung auf 72,8 (13,9) % gemessen. Bei der Lagerung der Leukozytensuspension in Thrombozytenlagerungsbeuteln zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum ein ganz anderer Verlauf der Phagozytose-Leistung, der, im Vergleich zur Lagerung im Plasmabeutel, signifikant besser war. Bereits nach 24 Stunden wurde eine Steigerung auf 106,3 (21,9) % gemessen, die sich nach 48 Stunden nochmals erhöht hatte (118,9 (14,8) %) und dann bis zum Abschluss der Untersuchungsphase annähernd gleich blieb (106,8 (15,2) %).

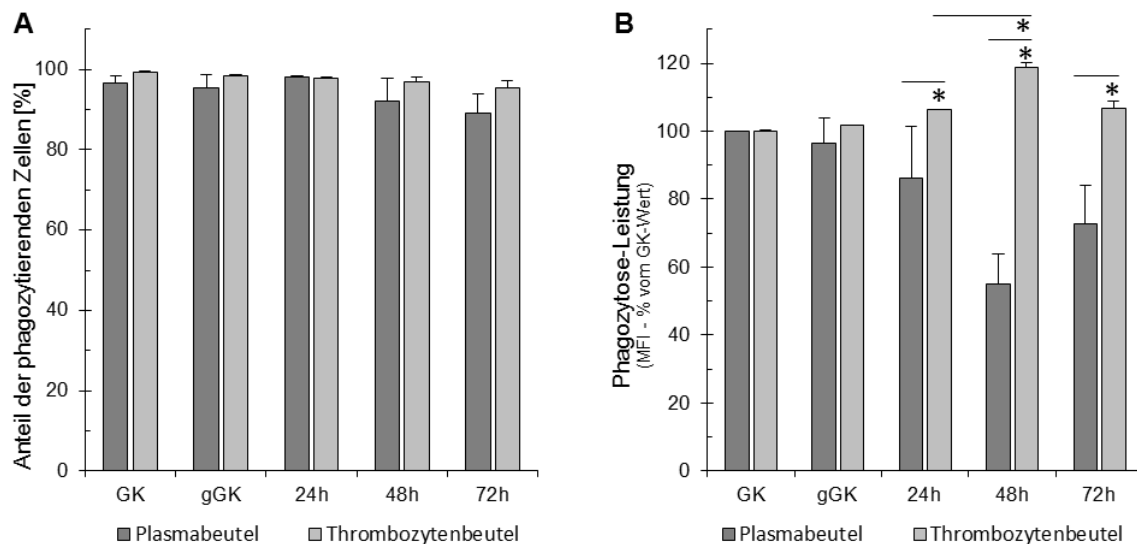


Abb. 48 (A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei der Lagerung im Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare; MFI = mean fluorescence intensity)

Bei der Analyse des prozentualen Anteils Oxyburst-aktiver Leukozyten (Abb. 49A) wurden sowohl innerhalb einer Lagerungsvariante (Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel) als auch zwischen den beiden getesteten Lagerungsbeuteln keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Innerhalb der ersten 48 Stunden produzierten in beiden Testansätzen annähernd 100,0 % der gelagerten Leukozyten freie Sauerstoffradikale. Nach 72 Stunden blieb dieser aktive Zellanteil mit 98,4 (0,6) % in den Thrombozytenbeuteln stabil. Bei der Lagerung in den Plasmabeuteln wurde eine minimale Reduktion auf 96,2 (7,5) % gemessen.

Bei den Messungen der intrazellulären Oxyburst-Leistung mit dem kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay (Abb. 49B) bzw. mit dem Chemilumineszenz-Test mit Luminol (Abb. 49C) zeigte sich, dass es bei der Lagerung im Plasmabeutel bis zu 24 Stunden lang zu einer stark erhöhten Ausschüttung von freien Sauerstoffradikalen kam. Bei der Lagerung im Thrombozytenbeutel kam es zwar auch zu einem leichten Anstieg der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Aufreinigung, der sich aber nicht über die nächsten 24 Stunden weiter verstärkt hatte und somit signifikant geringer ausfiel. Im weiteren zeitlichen Verlauf sank die Oxyburst-Leistung bei beiden Lagerungsansätzen kontinuierlich und annähernd parallel ab, so dass nach 72 Stunden die Menge der freigesetzten Sauerstoffradikale in der Lagerung im Plasmabeutel zum Teil immer noch signifikant höher war als im Thrombozytenlagerungsbeutel.

Bei der extrazellulären Chemilumineszenz-Messung mittels Lucigenin (Abb. 49D) zeigte sich ein ähnlicher Anstieg der Oxyburst-Leistung nach der Aufreinigung, jedoch blieb sowohl bei der Lagerung im Thrombozytenbeutel als auch im Plasmabeutel der weitere signifikante Anstieg innerhalb der ersten 24 Stunden aus. Wie die intrazelluläre Oxyburst-Aktivität ging auch die extrazelluläre Leistung im weiteren Lagerungsverlauf kontinuierlich zurück. Die Unterschiede zwischen den Resultaten der verwendeten Lagerungsbeutel fielen minimal aus.

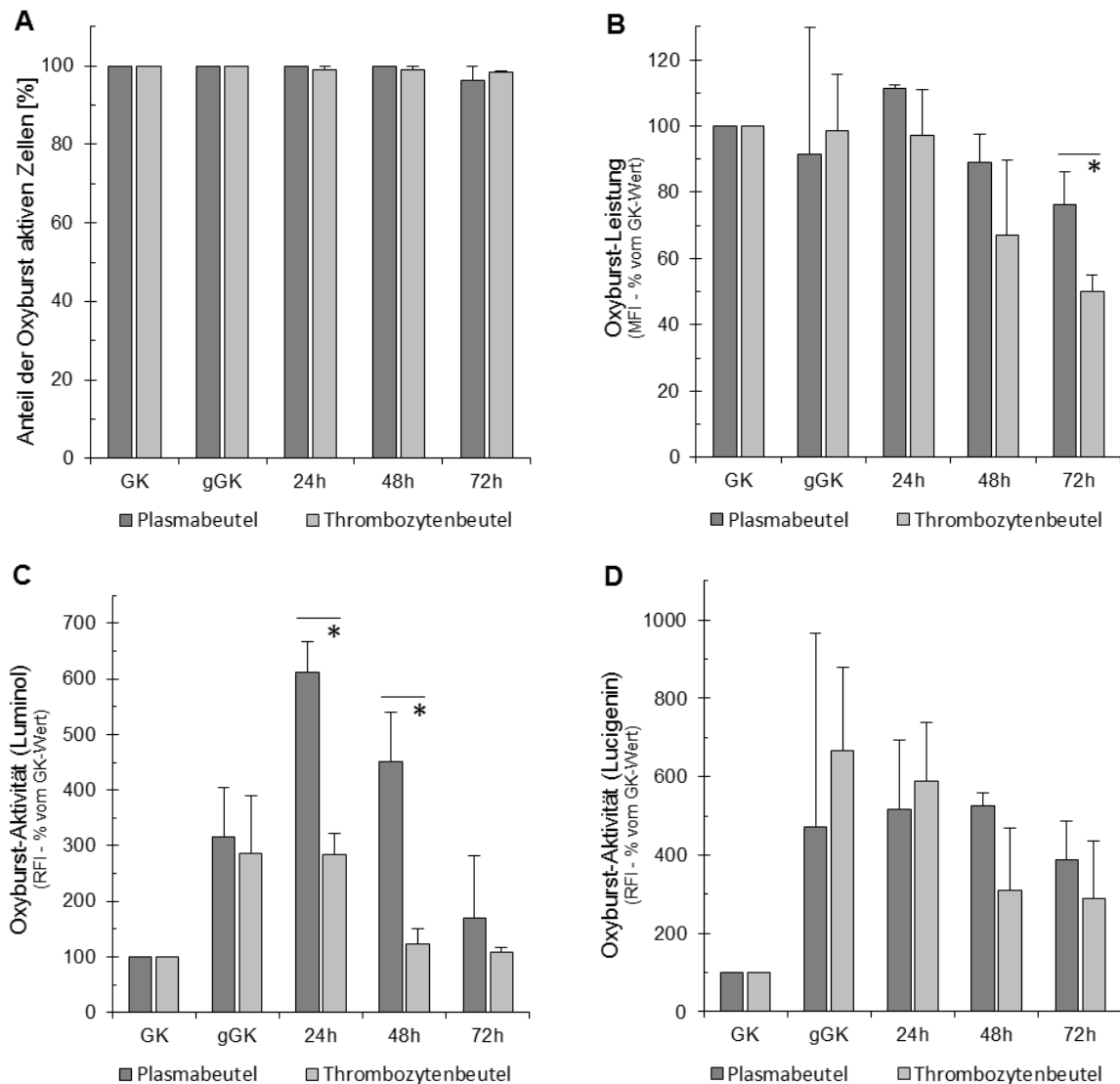


Abb. 49 (A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und deren Leistung/Aktivität mittels (B) kombiniertem Phagozytose-Oxyburst-Assay bzw. Chemilumineszenz-Assay mit (C) Luminol und (D) Lucigenin bezogen auf das GK bei der Lagerung im Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare; MFI = mean fluorescence intensity; RFI = relative fluorescence intensity)

Der kontinuierliche Verbrauch an Glucose (Abb. 50A) und der damit verbundene stetige Anstieg der Laktatkonzentration (Abb. 50B) im Plasma beider Lagerungsvarianten ließen auf einen funktionierenden Stoffwechsel schließen. Der höhere Glucoseverbrauch der im Plasmabeutel gelagerten Leukozyten könnte aber auch ein Zeichen von Stress sein, da sich die Zellen während der Lagerung im Ruhezustand befinden und somit weniger Glucose verbrauchen sollten.

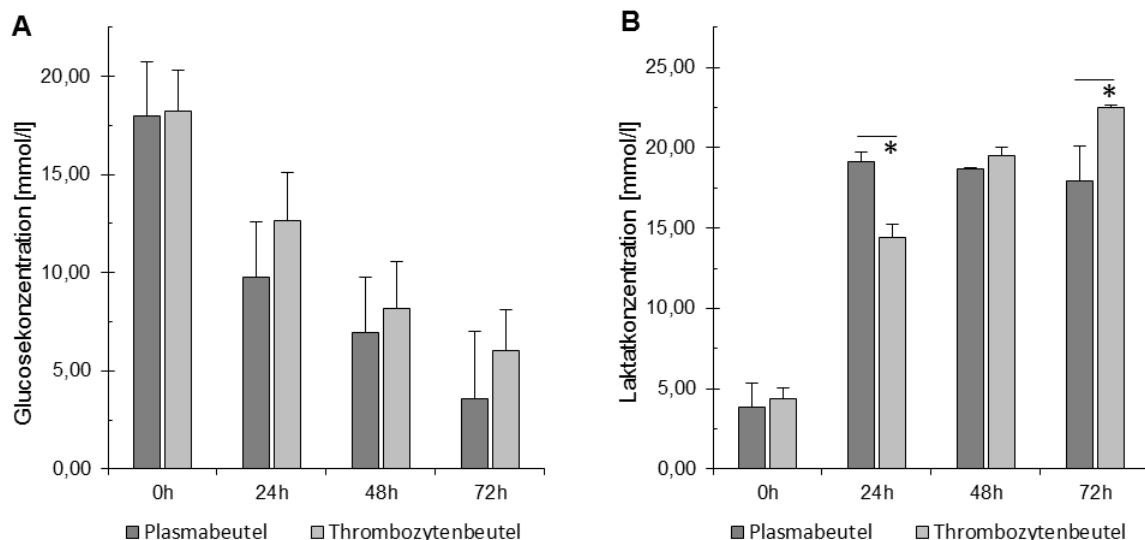


Abb. 50 (A) Glucose- und (B) Laktatkonzentration bei der Lagerung im Plasmabeutel bzw. Thrombozytenlagerungsbeutel über 72 Stunden (n = 3; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

4.3.5 Vergleich zwischen unfiltriertem und filtriertem CPD-Plasma als Lagerungsmedium

Auf Grundlagen der, im Rahmen dieser Dissertation, analysierten Ergebnisse scheint eine unbewegte Lagerung mit einer Leukozytenkonzentration von $5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ bei Raumtemperatur in Thrombozytenlagerungsbeutel die bestmögliche Variante zu sein, um die gereinigten Granulozytenkonzentrate aufzubewahren. Als Lagerungsmedium sollte dabei unfiltriertes, gepooltes CPD-Plasma verwendet werden.

Da konventionell hergestelltes CPD-Plasma noch Thrombozyten und viele lösliche Bestandteile, wie Gerinnungsfaktoren, Antikörper, Lipide, enthält, sollte in diesem Entwicklungsschritt geklärt werden, ob eine Filtration des CPD-Plasmas mittels $0,2 \mu\text{m}$ -Sterilfiltereinheit einen weiteren positiven Effekt auf die morphologischen und funktionalen Eigenschaften der Granulozyten hat.

4.3.5.1 Vergleich der Leukozytenzellzahl, Vitalität und Morphologie der gelagerten Granulozyten

Bei der Untersuchung der Zellzahl der Leukozyten (Abb. 51A) über den gesamten Lagerungszeitraum von 72 Stunden wurden keine signifikanten Veränderungen bei beiden Lagerungsvarianten festgestellt. Sowohl bei der Lagerung mit unfiltriertem als auch mit filtriertem CPD-Plasma wurde ein minimaler Verlust an Leukozyten gemessen. Nach 72 Stunden konnten im unfiltriertem CPD-Plasma noch 94,7 (21,2) % der anfangs gelagerten Leukozyten nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil bei der Lagerung mit filtriertem Plasma lag zu diesem Zeitpunkt mit 99,7 (22,5) % geringfügig höher. Diese positive Tendenz der Lagerung mit filtriertem CPD-Plasma wurde auch bei den vorherigen Messzeitpunkten festgestellt. Bei den gemessenen Vitalitätswerten der Leukozyten (Abb. 51B) wurde der positive Effekt des filtrierten CPD-Plasmas deutlicher. Neben der signifikanten Verbesserung über den gesamten Beobachtungszeitraum wurden auch signifikant bessere Einzelwerte zu den letzten beiden

Messzeitpunkten festgestellt. So wurde nach 48 Stunden bei der Lagerung mit filtriertem CPD-Plasma eine Vitalitätsrate von 93,0 (5,0) % und nach 72 Stunden von 96,0 (4,0) % gemessen. Der Anteil der vitalen Leukozyten bei der Lagerungsvariante mit herkömmlichem CPD-Plasma lag nach 48 Stunden lediglich bei 90,0 (3,0) % und nach 72 Stunden bei 93,0 (10,0) %.

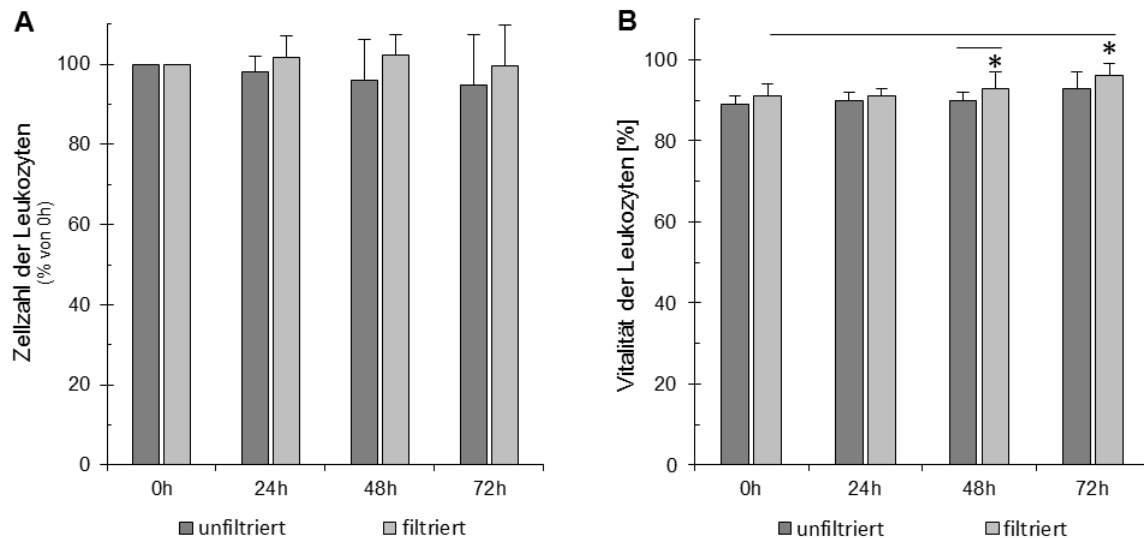


Abb. 51 (A) Zellzahl der Leukozyten prozentual zum Ausgangswert und (B) Vitalität der Leukozyten bei der Lagerung mit unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 5; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Auch die zu den Beobachtungszeitpunkten gemessenen LDH-Konzentrationen (Abb. 52) bestätigten den positiven Effekt des gefilterten CPD-Plasmas. So wurde zwar bei beiden Lagerungsvarianten ein Anstieg gemessen, der sowohl nach 48 Stunden (201 (133) U/l) als auch nach 72 Stunden (236 (177) U/l) bei der Lagerung mit unfiltriertem CPD-Plasma höher ausfiel. Die Vergleichswerte der Lagerung mit filtriertem CPD-Plasma lagen lediglich bei 141 (110) U/l und bei 200 (97) U/l.

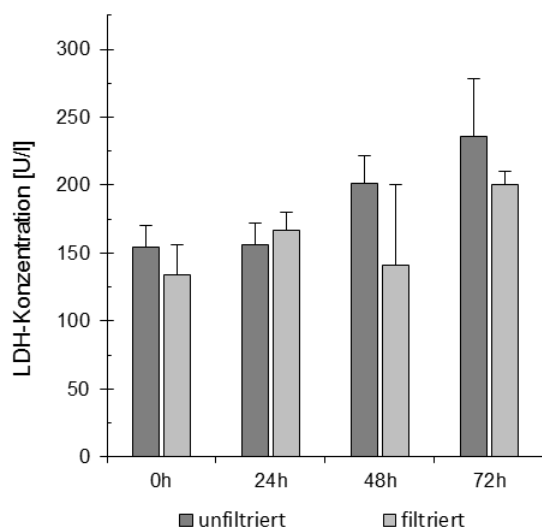


Abb. 52 LDH-Konzentration bei der Lagerung in mit unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 5; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf als nicht signifikant getestet)

Da das Prinzip der Trypanblaufärbung nur Aussagen über den Zellzustand zulässt, wenn diese bereits tot und somit ihre komplette Membranintegrität verloren haben, wurden zur weiteren morphologischen Beurteilung der gelagerten Leukozyten rasterelektronen- (Abb. 53) und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (Abb. 54) angefertigt. Die abgebildeten Aufnahmen wurden dabei so ausgewählt, dass sie einen realitätsnahen Auszug der Gesamtheit der gelagerten Leukozyten mit allen möglichen Veränderungen wiedergeben konnten. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf Anzeichen von Apoptose (Abnahme des Zellvolumens, Kondensierung des Zellkerns, Bildung von Membranbläschen mit anschließender Abschnürung) aber auch Nekrose (Zunahme des Zellvolumens, Zerstören der Zellorganellen, frühzeitiger Verlust der Zellmembranintegrität) gelegt.

Untersucht man die REM- und TEM-Aufnahmen hinsichtlich der Zellgröße wurden keine Veränderung festgestellt. Der ungefähre Anfangsdurchmesser von 7 bis 8 μm konnte nach 48 Stunden noch bei beiden Lagerungsvarianten abgeschätzt werden. Außerdem wiesen die Leukozyten eine kugelartige Form auf, die sich bei der mit filtriertem CPD-Plasma durchgeführten Lagerung bis 72 Stunden fortsetzte. Bei der Lagerung mit unfiltriertem CPD-Plasma verloren die Leukozyten zwischen 48 und 72 Stunden ihre Kugelform und nahmen an Zellvolumen zu, was ein deutliches Zeichen für beginnende Nekrose ist. Des Weiteren konnten keine klaren Abgrenzungen mehr zwischen den einzelnen Zellkörpern ausgemacht werden. Zusätzlich wurden Granulozyten entdeckt, bei denen, durch Platzen der Zellmembran, intrazelluläre Bestandteile nach außen getreten waren (Abb. 54D mit b gekennzeichnet). Neben diesen Merkmalen, die auf eine Nekrose schließen lassen, wurde in den TEM-Aufnahmen ebenfalls der typisch kondensierte Zellkern (Abb. 54D mit a gekennzeichnet) entdeckt, der ein klares Anzeichen von beginnender Apoptose bei einzelnen Granulozyten ist. Die mit filtriertem CPD-Plasma gelagerten Leukozyten wiesen nach 72 Stunden diese Apoptose- und Nekrose-Merkmale in den untersuchten Proben nicht auf.

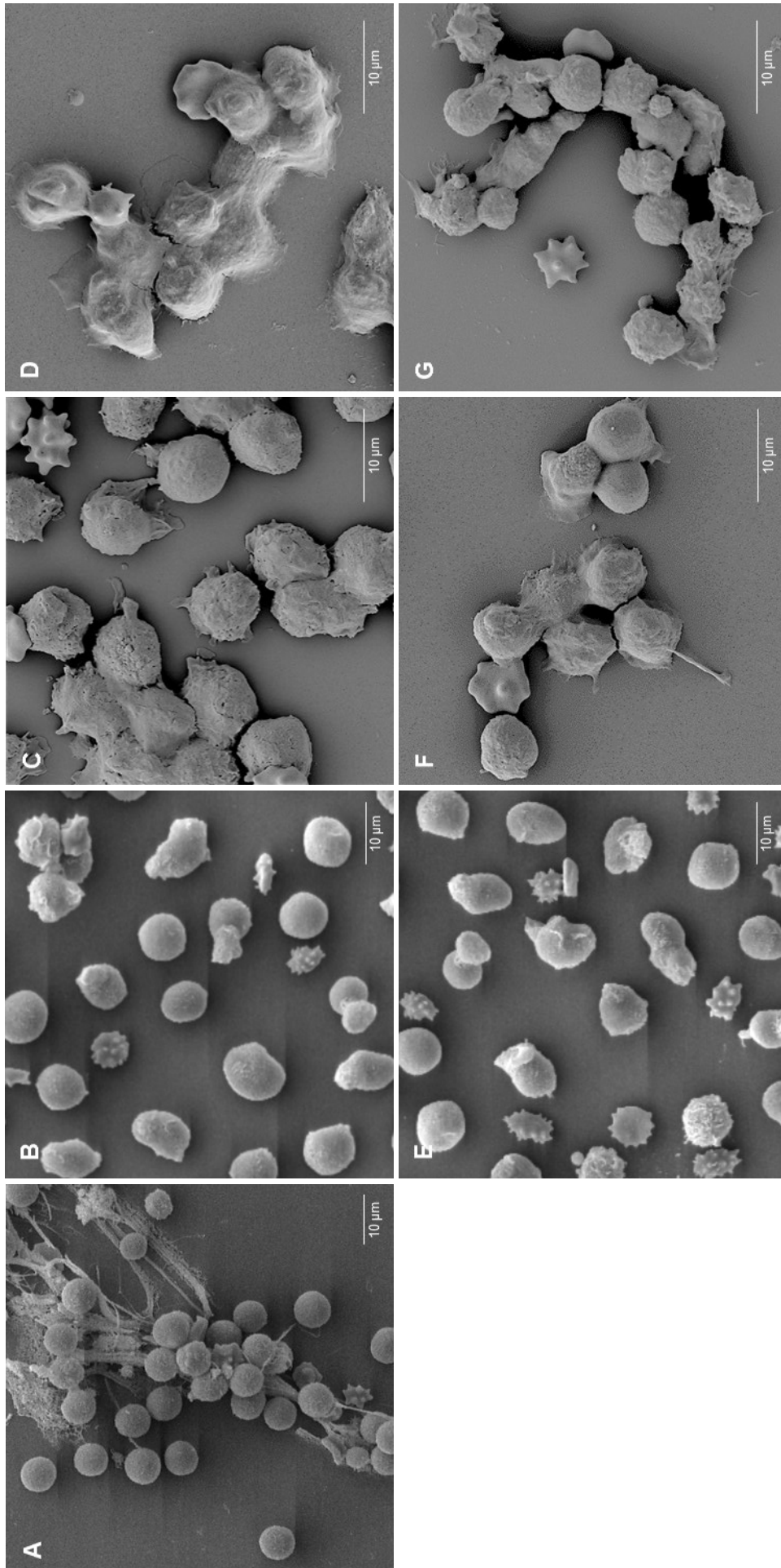


Abb. 53 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der, mit ungefiltertem CPD-Plasma (B-D) bzw. filtertem CPD-Plasma (E-G) gelagerten Leukozyten (A) gereinigtes Granulozytenkonzentrat als Ausgangsmaterial (1000x); gelagerte Leukozyten (B) nach 24 Stunden (1000x), (C) nach 48 Stunden (1020x), (D) nach 72 Stunden (1020x) mit ungefiltertem CPD-Plasma und (E) nach 24 Stunden (1000x), (F) nach 48 Stunden (1020x), (G) nach 72 Stunden (1020x) mit filtertem CPD-Plasma

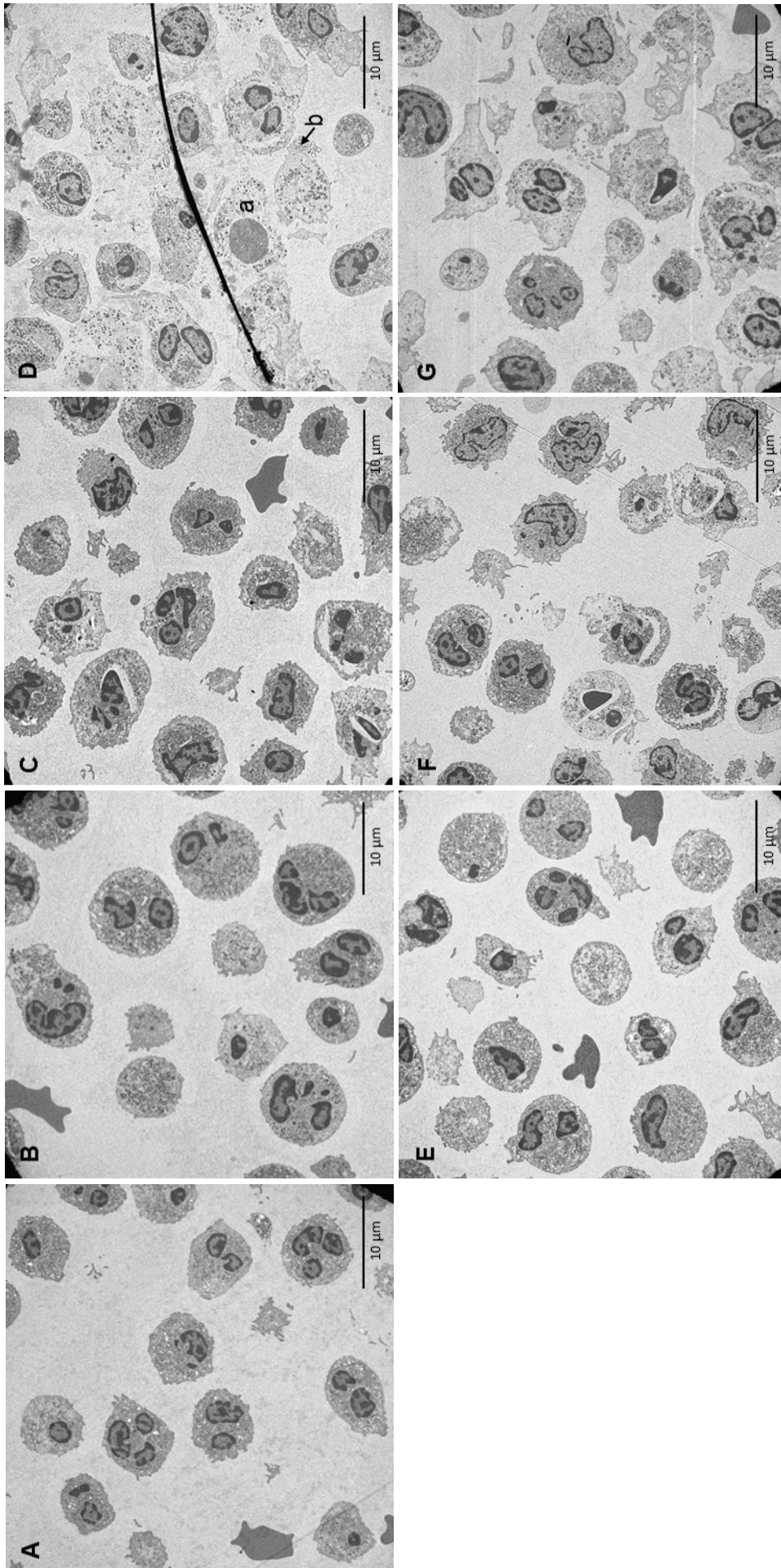


Abb. 54 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (900x) der, mit ungefiltertem CPD-Plasma (B-D) bzw. filtertem CPD-Plasma (E-G) gelagerten Leukozyten (A) gereinigtes Granulozytenkonzentrat als Ausgangsmaterial; gelagerte Leukozyten, (C) nach 24 Stunden, (D) nach 48 Stunden, (D) nach 72 Stunden mit unfiltriertem CPD-Plasma und (E) nach 24 Stunden, (F) nach 48 Stunden, (G) nach 72 Stunden mit filtertem CPD-Plasma; a = apoptotischer Granulozyt mit dem typisch kondensierten Zellkern, b = durch Platzen der Zellmembran in den Extrazellulärraum freigesetztes Cytoplasma eines nekrotischen Granulozyts

4.3.5.2 Vergleich der Funktionsparameter der gelagerten Granulozyten

Bei der Analyse des Anteils an phagozytierenden Granulozyten (Abb. 55A) wurde kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Lagerungsvarianten sichtbar. Ausgehend von einem Prozentsatz von 98,5 (1,5) % im Standard-Granulozytenkonzentrat blieb der Anteil auch nach der Aufreinigung stabil bei 98,6 (1,5) % (unfiltriert) bzw. 98,3 (1,7) % (filtriert). Über den gesamten Untersuchungszeitraum wiesen beide Lagerungsvarianten stets einen phagozytierenden Granulozytenanteil von über 98 % auf. Die Medianwerte lagen nach 72 Stunden bei 98,8 (3,2) % für den Lagerungsansatz mit unfiltriertem CPD-Plasma und bei 98,9 (2,4) % für die Lagerung im filtrierten Plasma.

Bei der Analyse der Phagozytose-Leistung (Abb. 55B), basierend auf der mittleren Fluoreszenzintensität, wurden Unterschiede zwischen den beiden Lagerungsvarianten sichtbar. Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass es bei beiden untersuchten Lagerungsvarianten zu einer signifikanten Leistungssteigerung über den Beobachtungszeitraum kam. Nach einem anfänglichen Rückgang durch die Aufreinigung erhielten sich die Granulozyten und wiesen nach 24 Stunden ähnliche (ungefiltert: 97,4 (45,1) %) oder verbesserte (filtriert: 112,9 (67,5) %) Leistungswerte auf. Bei den mit unfiltriertem CPD-Plasma gelagerten PMN blieb das Leistungsvermögen annähernd konstant, so dass nach 72 Stunden immer noch 96,2 (47,0) % der Ausgangsleistung gemessen werden konnten. Bei der Lagerungsvariante mit gefiltertem Plasma zeigte sich über die Zeit eine ganz andere Entwicklung der Phagozytose-Leistung. So kam es nach 24 Stunden zu einer weiteren Steigerung, so dass am Ende der Beobachtungszeit 122,4 (57,4) % der GK-Leistung durch die gelagerten Granulozyten erreicht wurde.

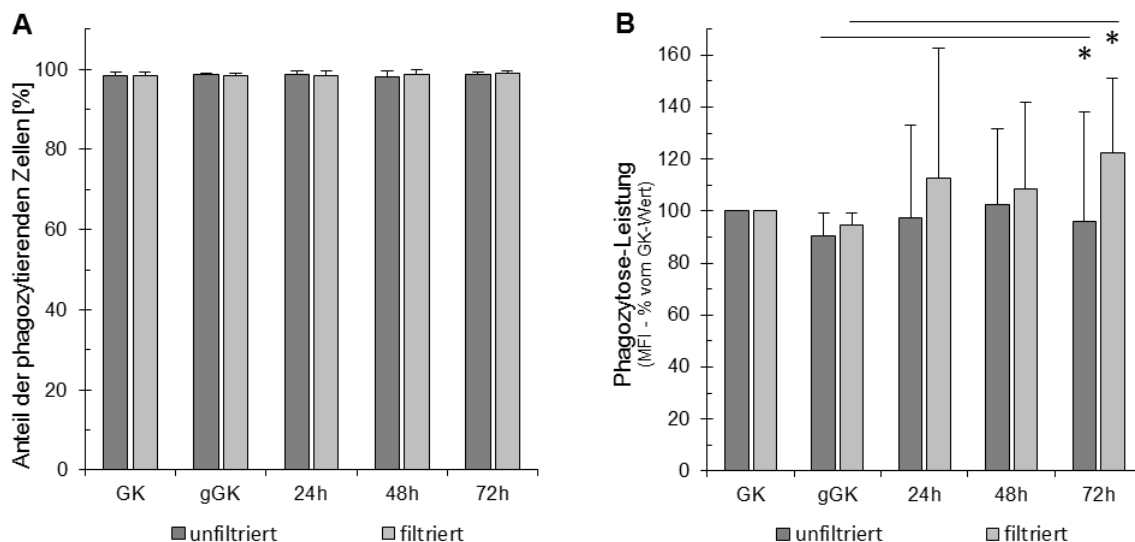


Abb. 55 (A) Anteil der phagozytierenden Granulozyten und (B) deren Leistung bezogen auf das GK bei der Lagerung mit unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 5; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare; MFI = mean fluorescence intensity)

Die positiven Phagozytose-Ergebnisse aus dem kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay spiegelten sich auch in den mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen wieder. In Abb. 56A sieht man deutlich die grün fluoreszierenden *E.coli*, die zu Beginn der Lagerung von den Granulozyten phagozytiert und sich optisch im Bereich zwischen Zytoskelett (rot) und Zellkern (blau) erkennen lassen. Auch nach 72-stündiger Lagerung waren sowohl die Granulozyten, die in unfiltriertem CPD-Plasma (Abb. 56B) gelagert wurden, als auch die Zellen, die in filtriertem CPD-Plasma gelagert wurden (Abb. 56C) in der Lage Phagozytose zu betreiben. Auch die Anzahl der aufgenommenen *E.coli* pro Zelle (Phagozytose-Leistung) schien dem Augenschein nach sich etwas erhöht zu haben.

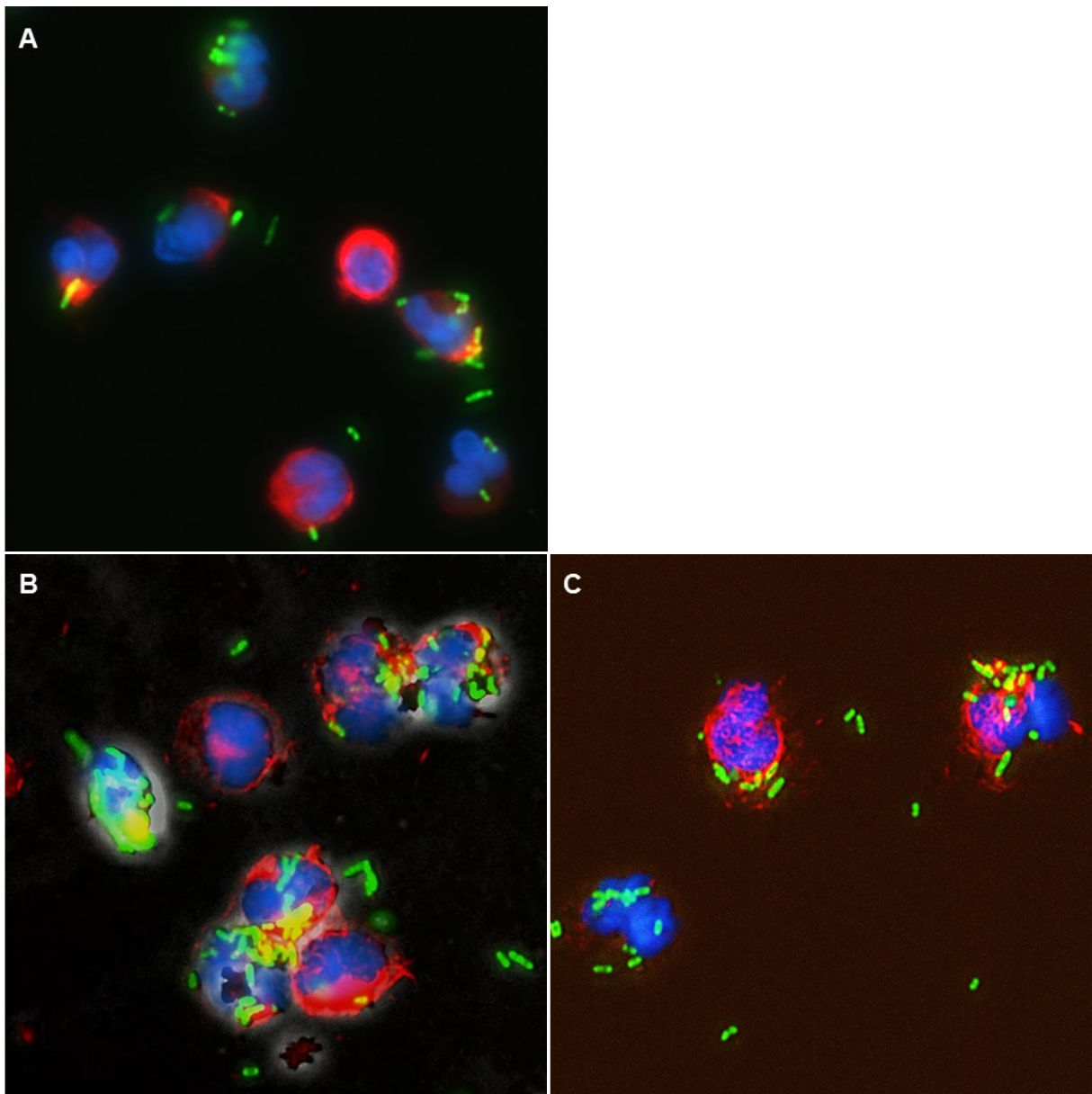


Abb. 56 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (600x) von phagozytierenden Granulozyten (A) zu Beginn der Lagerung und nach 72-stündiger Lagerung in (B) unfiltriertem bzw. (C) filtriertem CPD-Plasma (blau = Zellkern, rot = Zytoskelett/ Aktinfilament, grün = *E.coli*)

Auch bei der Analyse des prozentualen Anteils an Oxyburst-aktiven Granulozyten (Abb. 57A) wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Lagerungsvarianten festgestellt. Der Prozentsatz aktiver Zellen lag über den gesamten Beobachtungszeitraum zwischen 99 und 100 %. Bei der Auswertung der Messergebnisse des kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assays und der Chemilumineszenz-Messung mit Luminol für die intrazellulären Oxyburst-Leistung (Abb. 57B und C) zeigten sich ähnliche Verläufe bei den beiden Lagerungsvarianten. Durch die Aufreinigung kam es zu einer signifikanten Leistungssteigerung der ROS-Freisetzung, die sich bis einschließlich 24 Stunden noch weiter erhöhte. Innerhalb der nächsten 48 Stunden ging die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies im Zellinneren bei beiden Testansätzen langsam zurück, so dass für die Lagerung mit unfiltriertem CPD-Plasma mit dem kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay noch eine Leistung von 135,5 (107,9) % und mit der Chemilumineszenz-Messung noch eine Leistung von 421,2 (371,4) % im Vergleich zum Standard-GK ermittelt werden konnte. Die Messergebnisse für die Lagerung mit filtriertem CPD-Plasma lagen im Vergleich mit 128,7 (103,2) % für den Phagozytose-Oxyburst-Test und 431,8 (355,0) % für die Chemilumineszenz-Messung in ähnlichen Bereichen. Bei der Analyse der extrazellulären Oxyburst-Messung (Abb. 57D) zeigte sich über den Beobachtungszeitraum ein ganz anderes Bild. Es kam zwar durch die Aufreinigung ebenfalls zu einer signifikant erhöhten ROS-Freisetzung, die bis einschließlich 48 Stunden bei beiden Lagerungsvarianten annähernd stabil blieb. Erst nach 72 Stunden kam es zu einem Rückgang der Oxyburst-Leistung, der bei den Granulozyten, die mit filtriertem CPD-Plasma gelagert wurden, stärker ausfiel. So wurde eine Leistung von 509,9 (320,9) % vom Ausgangswert gemessen. Die prozentuale Oxyburst-Leistung in Bezug auf das GK lag bei der Lagerung mit unfiltriertem CPD-Plasma bei 609,8 (360,9) %.

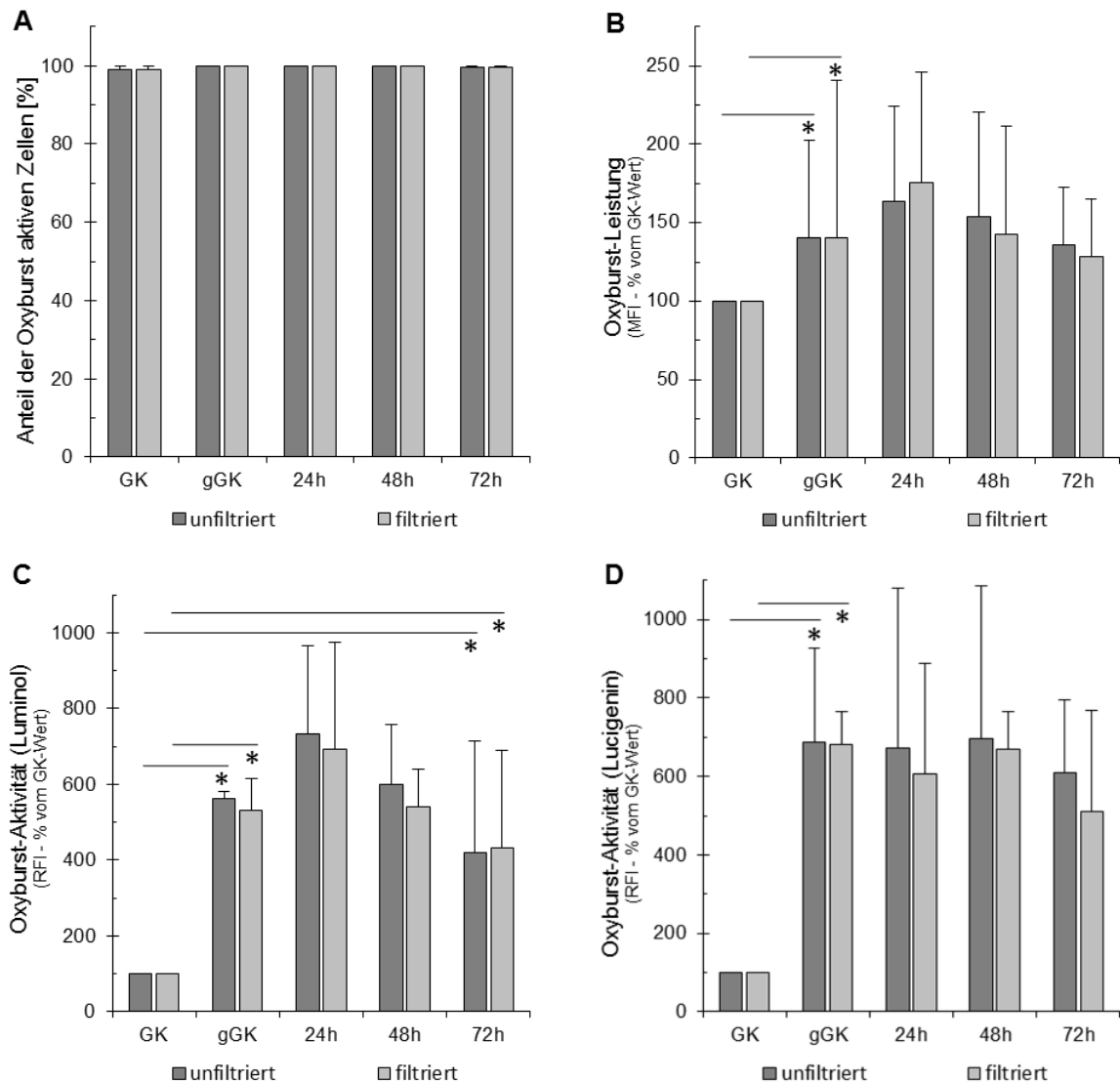


Abb. 57 (A) Anteil der Oxyburst-aktiven Granulozyten und deren Leistung/Aktivität mittels (B) kombiniertem Phagozytose-Oxyburst-Assay bzw. Chemilumineszenz-Assay mit (C) Luminol und (D) Lucigenin bezogen auf das GK bei der Lagerung mit ungefiltertem bzw. gefiltertem CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 5; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare; MFI = mean fluorescence intensity; RFI = relative fluorescence intensity)

4.3.5.3 Vergleich der pH-Werte, Partialdrücke der Blutgase und Glucose- und Laktatkonzentration der Lagerungsansätze

Generell ließ sich feststellen, dass es in beiden Lagerungsvarianten zu signifikanten Veränderungen der Glucose- und Laktatkonzentration (Abb. 58A und B) kam. Während die Glucosekonzentration in beiden Ansätzen stetig abnahm, akkumulierte das Laktat im Lagerungsmedium. Signifikante Unterschiede zwischen der Lagerung mit unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma konnten nicht festgestellt werden. So wurde nach 72 Stunden im Lagerungsansatz mit unfiltriertem CPD-Plasma noch eine Glucosekonzentration von 9,9 (7,4) mmol/l (Ausgangswert: 18,5 (0,8) mmol/l) und eine Laktatkonzentration von 21,8 (8,9) mmol/l (Ausgangswert: 3,3 (0,5) mmol/l) gemessen. Die Messergebnisse für die Lagerung mit filtriertem Plasma waren mit 9,8 (8,4) mmol/l und 22,7 (10,9) mmol/l auf einem ähnlichen Niveau.

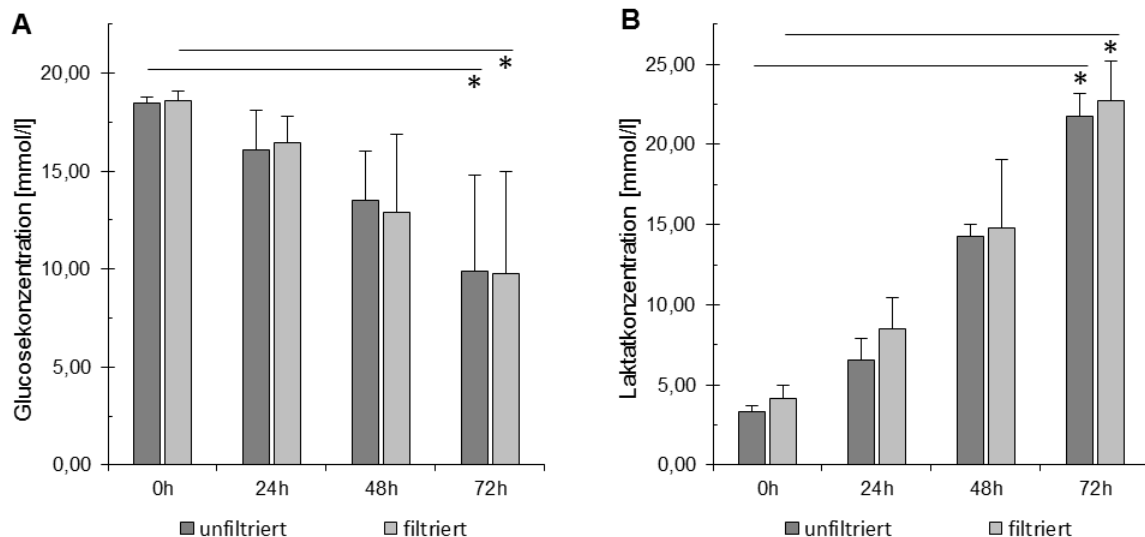


Abb. 58 (A) Glucose- und (B) Laktatkonzentration bei der Lagerung mit unfiltrierte bzw. filtrierte CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 4; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Auch bei der Analyse der gemessenen pH-Werte (Abb. 59) während der Lagerung gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Lagerungsvarianten. Jedoch reduzierte sich der pH-Wert jedes einzelnen Lagerungsansatzes signifikant während der untersuchten 72 Stunden. Von einem Anfangswert von 7,64 (0,15) ausgehend, sank der pH-Wert bei der Lagerung mit unfiltrierte CPD-Plasma auf 7,10 (0,45). Bei der Lagerung mit filtrierte Plasma verändert sich der pH-Wert von anfangs 7,71 (0,09) auf 7,12 (0,68) nach 72 Stunden.

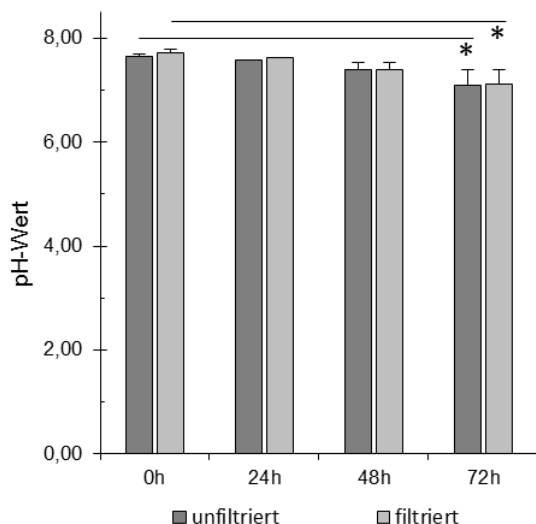


Abb. 59 pH-Wert der Leukozytensuspension, gelagert mit unfiltrierte bzw. filtrierte CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 5; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

Bei der näheren Betrachtung des Sauerstoffpartialdrucks (Abb. 60A) über den gesamten Lagerungszeitraum wurde ein Anstieg von 100 (10) mmHg auf 106 (22) mmHg bei der Variante mit filtrierte CPD-Plasma festgestellt. Bei der Lagerung mit unfiltrierte CPD-Plasma blieb der Sauerstoffpartialdruck konstant. Der Partialdruck für Kohlenstoffdioxid (Abb. 60B) blieb in beiden Lagerungsvarianten konstant, war aber bei der Lagerung mit unfiltrierte Plasma geringfügig höher.

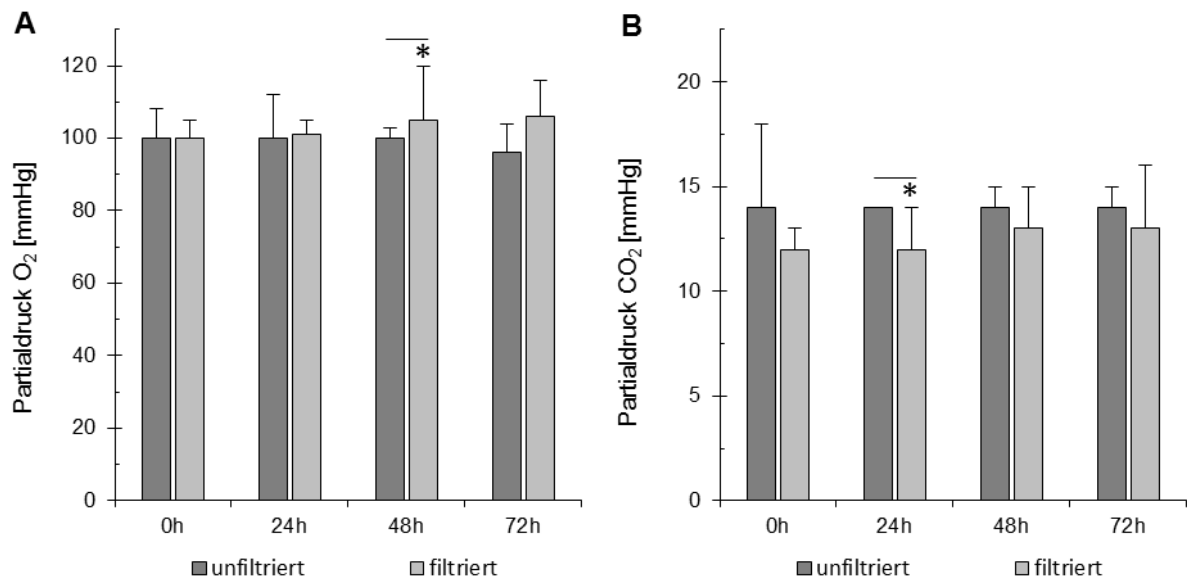


Abb. 60 Partialdrücke für (A) Sauerstoff und (B) Kohlenstoffdioxid bei der Lagerung in Plasmabeuteln bzw. Thrombozytenlagerungsbeuteln über 72 Stunden (n = 5; dargestellt sind Median und Maximum der Spannweite; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p<0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

4.3.5.4 Vergleich der Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD64 und CD89 während der Lagerung

Bei der Analyse des prozentualen Anteils an Granulozyten und Monozyten, die die ausgewählten Oberflächenmoleküle exprimierten (Abb. 63A und B), wurde nur ein minimaler Unterschied zwischen den beiden Lagerungsvarianten sichtbar. Generell ließ sich feststellen, dass sich der exprimierende Zellanteil über den gesamten Beobachtungszeitraum kaum veränderte. So wurde für CD11b, CD11c, CD14 und CD89 in beiden Lagerungsansätzen nach 72 Stunden der gleiche prozentuale Zellanteil wie im Standard-GK ermittelt. CD16, ein deutlicher Apoptose-Marker, CD35 und CD64 wiesen leichte Verluste gegenüber dem GK auf, auch wenn der Rückgang durch das filtrierte CPD-Plasma etwas abgeschwächt schien. Auffällig war, dass sowohl im GK als auch in beiden Lagerungsvarianten nur ein sehr geringer Zellanteil CD18 auf der Zelloberfläche exprimierte.

Um zusätzlich auch die Menge der exprimierten Oberflächenmoleküle abschätzen zu können, wurde die in Abb. 63C und D auch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) dargestellt und analysiert. Die Auswertung ergab, dass es, außer bei den Oberflächenmolekülen CD14 und CD16, zu einem unterschiedlich stark ausfallenden Anstieg der Expressionsrate auf der Oberfläche der Granulozyten und Monozyten über die untersuchten 72 Stunden kam. Die Menge an exprimiertem CD18 blieb hingegen konstant. Lediglich CD14 und CD16, ein Oberflächenmarker, der bei beginnender Apoptose deutlich geringer exprimiert wird, wiesen am Ende des Beobachtungszeitraums minimal schlechtere Werte auf.

4.3.5.5 Vergleich der Sekretion ausgewählter Zytokine während der Lagerung

Da neutrophile Granulozyten ein breites Spektrum an Zytokinen sezernieren, wurden die Plasmakonzentrationen sowohl von Vertretern der proinflammatorischen (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α) und der antiinflammatorischen Zytokine (IL-10), als auch vom Chemokin IL-8 über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 Stunden gemessen.

Bei der Analyse der unterschiedlichen Zytokinkonzentrationen über den Zeitraum der Lagerung in unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma konnte festgestellt werden, dass es zwischen den beiden Varianten keine Unterschiede gab. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der einzelnen Zytokine, wurde auffällig, dass es bei IL-1 β und IL-6 einen kontinuierlichen Anstieg der Plasmakonzentration über die untersuchten 72 Stunden gab. Bei IL-6 fiel die Anreicherung signifikant aus. Bei IL-10 und dem Chemokin IL-8 zeigte sich ein sehr ähnlicher Verlauf. Bis einschließlich 24 Stunden lag die Plasmakonzentration unterhalb der Nachweisgrenzen der verwendeten ELISA-Kits, d.h. für IL-8 unter 4,4 pg/ml und für IL-10 unter 2,0 pg/ml Zytokin. Nach 48 Stunden kam es bei IL-8 zu einem sprunghaften Anstieg der Plasmakonzentration, der sich auch innerhalb der nächsten 24 Stunden noch deutlich verstärkte. Bei dem Zytokin IL-10 fiel die Konzentrationssteigerung deutlich geringer aus. Die beiden proinflammatorischen Zytokine INF- γ und TNF- α wiesen kaum sichtbare Konzentrationsänderungen über den Lagerungszeitraum auf und lagen nach 72 Stunden annähernd auf dem gleichen Niveau wie zu Beginn der Lagerung. Eine tabellarische Zusammenfassung der Messergebnisse (Tab. 11) befindet sich im Anhang.

5 Diskussion

5.1 Granulozytenkonzentrate – Status Quo

Der menschliche Körper ist Tag für Tag einer enormen Zahl von pathogenen Erregern verschiedenster Arten (bakteriell, viral und mykotisch) ausgesetzt. Für eine effektive Abwehr dieser exogenen Angriffe spielt die native oder angeborene Immunantwort eine zentrale Schlüsselstelle. Neutrophile Granulozyten bilden mit ihrer Vielzahl verschiedenster Eigenschaften eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Pathogenen. Hierzu gehören neben ihrer Mobilität und der Einwanderung in befallenes Gewebe auch die Erregereliminierung mittels Phagozytose, NETose und der Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Oxidativer Burst bzw. Oxyburst). Neutropene Patienten, d.h. Patienten die unter einer Dysfunktion der Granulozyten leiden oder deren Granulozytenzahl im Blut stark dezimiert ist ($<1 \times 10^6/\text{ml}$), müssen daher vor schweren Infektionen des gesamten Organismus geschützt werden. Neben geeigneten Schutz- und Isolationsmaßnahmen (wenig Personenkontakt, Mund-Nasen-Schutz) als Prophylaxe, bietet, bei nachgewiesenen Infektionen, eine kalkulierte Antibiose ebenfalls eine Behandlungsmöglichkeit. Diese Option kann unter bestimmten Umständen auch prophylaktisch eingesetzt werden [22]. Eine weitere Option ist die Gabe von Granulozytenkonzentraten [42]. Neben dem therapeutischen Bedarf an funktionsfähigen Granulozyten in den verschiedensten medizinischen Bereichen [43; 44], erhöht sich auch die Nachfrage in wissenschaftlichen Bereichen der Medizin [45; 46], Biologie und pharmazeutischen Industrie [47].

Die Idee die fehlenden oder funktionsverminderten Granulozyten durch Spenderzellen zu ersetzen, stammt aus den 1970er und 1980er Jahren [48; 49; 50; 51; 52; 53; 54]. Hauptproblem dieser Zeit waren die geringen Mengen an Granulozyten, die aus gesunden Spendern gewonnen werden konnten. Mit der Herstellung und Anwendung des Granulozyten-koloniestimulierenden Faktors G-CSF Mitte der 1990er Jahre konnte auch die gezielte Aktivierung der Granulozytenfreisetzung aus dem Knochenmark zur Behandlung von neutropenen Zuständen genutzt werden [20]. Price et al. zeigten, dass es innerhalb weniger Stunden nach Gabe von G-CSF zu einem signifikanten Anstieg der zirkulierenden Granulozyten im Blut kommt, da vermehrt Neutrophile aus dem Knochenmarkpool in den zirkulierenden Pool ausgeschüttet, die Produktion im Knochenmark angeregt und die Differenzierung der Zellen beschleunigt werden [55]. Da die Wirksamkeit von G-CSF von weiteren Faktoren (gesundes Ausgangsgewebe, Zytokine, etc.) abhängig ist, kann bei ausbleibenden Therapieerfolgen auch die Transfusion von Granulozytenkonzentraten in Erwägung gezogen werden.

Für die Isolation vitaler und funktionsfähiger Granulozyten aus Vollblut stehen verschiedenste Techniken und Protokollen, wie die Nutzung von Sedimentationsbeschleunigern oder Dichtegradienten-Zentrifugation, zur Verfügung [56; 57; 58], die ständigen Optimierungen durch diverse Arbeitsgruppen unterliegen [59]. Um heutzutage Granulozytenkonzentrate mit einer

therapeutisch wirksamen Dosis an Neutrophilen herstellen zu können, werden ausschließlich gesunde Spender mit Wachstumsfaktoren und/oder Kortikosteroiden konditioniert, um die Zahl der im Blutstrom zirkulierenden Granulozyten zu erhöhen.

Die in dieser Dissertation verwendeten Standard-Granulozytenkonzentrate (GK) wurden nach einer Standardarbeitsanweisung [60] des Instituts für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock im Apherese-Verfahren mittels Sedimentationsbeschleuniger hergestellt. Wie bereits aufgeführt (Vgl. 4.1) lag der Median des Gesamtgehalts an Leukozyten bei $33,6 \times 10^9$ pro Präparat. Den Anteil an neutrophilen Granulozyten machten dabei 75,0 % ($25,2 \times 10^9$ PMN) des Aphereseproduktes aus. Die Leukozyten der Granulozytenkonzentrate wiesen Vitalitäten von durchschnittlich 92,2 % auf. Diese Werte stimmen gut mit den aus der Literatur berichteten Konzentrationen überein. Eine Übersichtsarbeit von Heuft et al. zeigte beispielsweise, dass sie durch die Stimulation der Spender mit $1,5 \mu\text{g}$ G-CSF/kg Körpergewicht plus Dexamethason durchschnittlich $27,3 \times 10^9$ Leukozyten pro Granulozytenapheresat erhalten, wovon $24,5 \times 10^9$ neutrophile Granulozyten waren [27].

Da während der Apherese mit der COBE Spectra® manuell in der leukozytenreichen Schicht zwischen Erythrozyten- und Thrombozytenfraktion gesammelt wird [61], enthalten die fertigen Aphereseprodukte ebenfalls eine große Menge an Thrombozyten (103×10^9) und Erythrozyten (690×10^9). Dieser Fakt wird auch durch einen durchschnittlichen Hämatokrit von 20,8 % deutlich. Auf Grund dieser zellulären Zusammensetzung könnte man bei Granulozytenkonzentraten auch von einer Granulozyten angereicherte Vollblutspende sprechen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zelluläre Zusammensetzung der, in dieser Dissertation verwendeten, Granulozytenkonzentrate die Qualitätsansprüche der Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen der Bundesärztekammer [23] erfüllen.

Betrachtet man die Funktionalität der Granulozyten im Hinblick auf Phagozytose und oxidativen Burst konnte keine Beeinträchtigung der Zellen durch die Apherese festgestellt werden. Mit den durchgeführten Experimenten wurde nachgewiesen, dass 98,5 % der im Standard-Präparat enthaltenen Granulozyten die ihnen angebotenen FITC-*E.coli* phagozytiert hatten. 99,8 % der Granulozyten setzten nach Stimulation mit opsonisierten *E.coli* Sauerstoffradikale im Zellinneren frei und betrieben somit aktiv oxydativen Burst. Die von Joos et al. beschriebene Steigerung der Phagozytose- und Oxyburstaktivität durch G-CSF Stimulation der Granulozytenspender konnte nicht untersucht werden, da Blutproben der Spender vor der Konditionierung nicht zur Verfügung standen [62].

Durchflusszytometrisch konnten auf der Oberfläche der Leukozyten aus dem Standard-Granulozytenkonzentrat der LPS-Rezeptor CD14, die Fcγ-Rezeptoren I (CD64) und III (CD16), der Fcα-Rezeptor (CD89), der Komplementrezeptor 1 (CD35) und die α-Untereinheiten (CD11b und CD11c) und die β-Untereinheit der Komplementrezeptoren 3 und 4 nachgewiesen werden.

Die beiden Komplementrezeptoren CR3 und CR4 gehören zu der Proteinfamilie der β_2 -Integrine und haben neben der Erkennung von opsonisierten Erregern und der Phagozytoseaktivierung auch die Aufgabe, den ständig auftretenden, kurzfristigen Kontakt der PMN mit dem Endothel nach Aktivierung durch inflammatorische Mediatoren zu verlängern um eine gezielte Einwanderung der Granulozyten in Gewebe zu ermöglichen. Bei der Analyse der Standard-Granulozytenkonzentrate wurden auf den meisten Neutrophilen die α -Untereinheiten CD11b und CD11c in hohem Maße exprimiert. Die gemeinsame β -Untereinheit CD18 hingegen konnte nur auf einem geringen Prozentsatz der Granulozyten und in einem sehr geringen Maß nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das im Zytoplasma lokalisierte CD18 erst nach Bindung von z.B. C3bi, Fibrinogen oder ICAM-1 und ICAM-2 und anschließender Aktivierung des PMN auf dessen Oberfläche exprimiert wird [63; 64]. Zimmermann et al. zeigten durch das Blockieren der einzelnen Untereinheiten mittels kompatibler Antikörper, dass CD11b das entscheidende Oberflächenmolekül für eine effektive Phagozytoseaktivierung ist [65]. Die Untersuchungsergebnisse für die Fc γ -Rezeptoren, die wichtige Phagozytosevermittler sind, zeigten, dass sie sich in ihrer Verteilung auf den Zellen und ihrer Affinität und Spezifität zu Liganden unterscheiden. Während Fc γ R I und III eher mit IgG interagiert, bindet Fc α R eher Immunkomplexe, die mit IgA markiert sind [13].

In den Standard-Granulozytenkonzentraten wurden hauptsächlich proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α) und das Chemokin IL-8 in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Die teilweise sehr großen Spannweiten können dem Einfluss der unterschiedlichen Spender (ein Spender/GK) und ihrem „immunologischen“ Grundzustand, der durch verschiedene Lebensumstände, wie z.B. Rauchen oder Sport [46; 66; 67; 68] beeinflusst werden kann, geschuldet sein.

5.2 Sedimentation mit Hydroxyethylstärke und Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung reduzieren den Anteil an Erythrozyten und Thrombozyten signifikant

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, ein Standard-Granulozytenkonzentrat (GK) durch geeignete Prozessierung (Sedimentation, Zentrifugation, Waschung) vom Großteil der Erythrozyten und Thrombozyten zu befreien, und somit eine Lagerung, die speziell auf Leukozyten bzw. Granulozyten ausgelegt ist, über 24 Stunden hinaus anschließen zu können.

Eine weit verbreitete Isolationsmethoden für Granulozyten ist die Dichtegradienten-Zentrifugation [56; 69; 70]. Bei diesem physikalischen Verfahren werden die verschiedenen Blutzellen in Abhängigkeit ihrer Größe und Dichte unter Einfluss von Zentrifugalkräften in einem Gradientensystem sortiert. Da Neutrophile in ihrer Größe und Granularität variieren, kann es zum Einwandern in andere Bereiche des Konzentrationsgradienten kommen. Da nur die den

Granulozyten entsprechende Schicht weiterverwendet wird, könnte es zu einem stärkeren Verlust an Granulozyten kommen. Dieses Phänomen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [71; 72] und konnte durch diverse Reagenzglasexperimente während der Laborarbeiten zur Dissertation von Dr. med. Antje Lübcke zur Herstellung einer Leukozytenpräparation bestätigt werden [41]. Da in der Zukunft eine therapeutische Anwendung der gewonnenen Granulozyten geplant ist, müsste die Aufreinigung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation in einem hochskalierten, geschlossenen System durchgeführt werden. Solche Systeme sind bereits für die Gewinnung von mononuklearen Zellen aus Knochenmark kommerziell erhältlich. So beschrieben Aktas et al. eine solche Aufreinigungsmethode mit dem Sepax Dichtegradient-basiertem Separationsprotokoll der Firma Biosafe (Eysins, Schweiz) in Verbindung mit dem Ficoll®-Kit CS-900. Durch die sich anschließende Zentrifugation wurden die Monozyten von den restlichen Blutbestandteilen (Neutrophilen, Erythrozyten, Thrombozyten) getrennt und in einen separaten Beutel abgeleitet. Sie konnten mit diesem Verfahren eine Erythrozytendepletion von 99,6 % und eine Thrombozytenreduktion von 86 % bei einer gleichzeitigen Granulozyten-Wiederfindungsrate von 92 % erzielen [73]. Eine Nutzung dieser Separationsmethode zur Gewinnung einer hochreinen Granulozytenpopulation wäre nicht von Vorteil, da die Granulozyten zusammen mit den Erythrozyten und Thrombozyten in einem Abfallbehälter aufgefangen werden und zu einer effektiven Aufreinigung weiterprozessiert werden müssten.

Um trotzdem eine signifikante Reduktion der Erythrozyten und Thrombozyten, sollten Sedimentationsbeschleuniger, wie Dextran oder Hydroxyethylstärke (HES), mit verschiedenen Molekülmassen eingesetzt werden. Diese Sedimentationsbeschleuniger, die in der Medizin als Volumenersatzmittel zum Einsatz kommen, werden mit der Aktivierung neutrophiler Granulozyten (z.B. Stimulation der Sauerstoffradikalfreisetzung) in Verbindung gebracht [74; 75; 76]. Diese stimulierenden Effekte werden in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. So beschrieben Rhee et al. die Oxyburst steigernde Wirkung von Dextran und Hydroxyethylstärke in schwerkranken Patienten und in Tiermodellen [77; 78; 79]. Andere Arbeitsgruppen konnten diese stimulierenden Eigenschaften nicht nachweisen und die durch Rhee et al. beschriebenen Beobachtungen somit nicht bestätigen [80]. Eine Erklärung könnten die verschiedenen, in den Studien verwendeten Methoden und ausgewählten Testparameter sein. Auf Grund dieser gegensätzlichen Literaturangaben wurden die stimulierenden Eigenschaften auf Leukozyten mit denen in unserem Labor etablierten und bereits in der Dissertation von Dr. med. Antje Lübcke veröffentlichten Methoden untersucht. Sie konnte eine Oxyburst steigernde Wirkung für beide Sedimentationsbeschleuniger nachweisen, die aber für Dextran signifikant höher ausfiel [41]. Daher wurde, basierend auf den Erkenntnissen aus Literatur und den Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe, die Hydroxyethylstärke als Sedimentationshilfe für die Aufreinigung von Standard-Granulozytenkonzentraten ausgewählt.

Für die ersten Downscaling-Versuche mit Standard-Granulozytenkonzentraten wurde das Arbeitsprotokoll für die Herstellung eines Leukozytenkonzentrates aus Buffy Coats adaptiert [41]. Als Sedimentationsbeschleuniger diente dabei Infukoll® HES 6 % (Mw 200.000), kurz HES 200, da dieses auch bei der Herstellungssapherese zur Auftrennung der Zellschichten verwendet wird und somit zu Teilen auch im aufzureinigenden Blutprodukt enthalten ist. Da der gesamte Aufreinigungsprozess ca. zwei Arbeitsstunden in Anspruch nimmt, sollte getestet werden, ob der 35 bis 40-minütige Sedimentationsschritt durch einen kürzeren Zentrifugationsschritt ersetzt werden könnte. Nach der Zentrifugation lag die Leukozytenschicht direkt auf dem Erythrozytensediment aus, so dass dieses nur schlecht und unvollständig abgenommen werden konnte. Es kam daher zu großen Verlusten bei der Leukozytenzahl und einer deutlich geringeren Reduktion an Erythrozyten verglichen zur HES-Sedimentation. Auf Grund der schlechteren Aufreinigungsergebnisse wurde von der Integration eines Zentrifugationsschrittes in das Protokoll abgesehen.

Buffy Coats und standardisierte Granulozytenkonzentrate unterscheiden sich deutlich in ihrer leukozytären Zusammensetzung. Während ein Buffy Coat ähnlich wie Vollblut ca. 34 % Lymphozyten, 4 % Monozyten, 3 % eosinophile und basophile Granulozyten und 59 % neutrophile Granulozyten enthält [5; 81], ist in den Standard-Granulozytenkonzentraten der prozentuale Anteil der Neutrophilen mit 75 % und der Monozyten mit 13 % deutlich höher. Der lymphozytäre Anteil hingegen ist mit 12 % stark minimiert (Vgl. 4.1). Auf Grund der Herstellungsmethode enthalten GKs im Gegensatz zu Buffy Coats aber bereits eine undefinierte Menge an Hydroxyethylstärke [82], so dass vorab im Downscaling-Modell getestet wurde, ob es notwendig ist, (a) das gleiche Volumen an HES 200 zu dem Granulozytenapheresat zuzugeben wie bei der Herstellung eines Leukozytenkonzentrates aus Buffy Coats [41] und (b), ob eine Zugabe von weiterem HES 200 zum Standard-GK notwendig ist. Bryant et al. beschrieben 2010 eine Methode zur Erythrozytenreduktion in Granulozytenkonzentraten mittels einfacher Sedimentation ohne die weitere Zugabe von Hydroxyethylstärke. Die Depletion der roten Blutzellen lag mit der dargestellten Prozessierung bei 92 ± 4 % und die Wiederfindungsrate an neutrophilen Granulozyten bei 80 ± 15 %, jedoch dauerte die Sedimentationsphase bis zu einer klaren Trennlinie zwischen Erythrozytensediment und leukozytenhaltigem Überstand 267 ± 48 Minuten [83]. Deshalb wurde in dieser Dissertation die Idee verfolgt, ob durch die weitere Zugabe von HES 200 eine stärkere „Verklebung“ der Erythrozyten und somit eine schnellere Sedimentation erzielt werden könnte. Hierfür wurden vier verschiedene Verhältnisse zwischen Granulozytenkonzentrat und Hydroxyethylstärke (Vgl. 4.2.1.2) getestet. Es zeigte sich, dass eine Zusammensetzung von einem Volumenteil GK und einem halben Volumenteil HES 200 die bestmögliche Abreicherung an Erythrozyten erzielt. Die Sedimentationszeit bis zu einer deutlich erkennbaren Trennlinie konnte dabei im Vergleich zu Bryant et al. von über 4 Stunden auf 35 bis 40 Minuten verkürzt werden.

Mit den Erkenntnissen aus den vorherigen Experimenten wurden dann vergleichende Untersuchungen mit Infukoll® HES 10 % (Mw: 450.000), kurz HES 450, durchgeführt (Vgl.

4.2.1.3). Die Verwendung von HES 450 brachte jedoch schlechtere Resultate bei der Abreicherung der Erythrozyten und der Wiederfindungsrate sowohl an Leukozyten, als auch bei den einzelnen Subpopulationen. So wurde von einer Applikation der hochmolekularen Hydroxyethylstärke im Aufreinigungsprozess für Granulozytenkonzentrate abgesehen.

Bei allen Downscaling-Versuchen schlossen sich an die Sedimentation mit Hydroxyethylstärke zwei Waschschrte an. Hierfür wurde auf Basis von vorhergehenden Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) verwendet [41]. Das Waschen des zentrifugierten Sedimentationsüberstands diente zwei Zwecken:

1. der Abreicherung der enthaltenen Thrombozyten, da diese bei einer unbewegten Lagerung, wie sie bei Granulozyten empfohlen wird [23], zur Bildung von Agglutinaten neigen. Thrombozytenkonzentrate sollen deshalb während ihrer Lagerung gleichmäßig bewegt werden [23; 84; 85]. Außerdem wurden in der Literatur immunregulatorische Effekte, wie die Aktivierung von Granulozyten zur NETose, bei aktivierten Thrombozyten beschrieben [86; 87; 88]. Für eine anschließende Lagerung wäre eine stärkere Voraktivierung der Leukozyten, und im Speziellen der Granulozyten, voraussichtlich nicht von Vorteil.

2. der weitgehenden Entfernung der eingesetzten Hydroxyethylstärke, da deren Einsatz in der Medizin stark umstritten und momentan sehr kontrovers diskutiert wird. So betonen Gegner dieser Volumenersatzmedikamente in einer Vielzahl von Übersichtsartikeln, dass die Anwendung bei bestimmten Patientengruppen (Sepsis, Verbrennungen) zu Nierenschädigungen, zu erhöhtem Blutungsrisiko und zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate führen kann [89; 90; 91; 92]. Befürworter von HES kämpfen gegen deren Verbannung als Plasmaexpander aus der Klinik und zweifeln offen die durchgeführten Studienmethoden der Gegner an [93] und beklagen gleichzeitig den Mangel an aussagekräftigen und detaillierten Studien [94].

Da der Einfluss von HES derzeit noch nicht abschließend geklärt werden kann, muss die Entfernung der Hydroxyethylstärke durch die Waschschrte im entwickelten Aufreinigungsprotokoll potentiell als Vorteil gesehen werden.

Insgesamt wurden in den Downscaling-Versuchen 12 Standard-Granulozytenkonzentrate mittels einfacher Sedimentation im GK-HES-Verhältnis 1:0,5 aufgereinigt (Vgl. 4.2.1.2). Mit dieser Methode konnten ca. 77 % der Leukozyten aus dem Ausgangspräparat gewonnen werden. Zwar fiel der Verlust an weißen Blutzellen signifikant aus, lag aber bei detaillierterer Betrachtung der einzelnen Subpopulationen hauptsächlich bei den Lymphozyten. Im gereinigten Präparat konnten nur noch ca. 49 % nachgewiesen werden. Der Anteil der phagozytierenden Blutzellen lag hingegen bei ca. 88 % (Monozyten) und 82 % (neutrophile Granulozyten). Die gereinigten Granulozytenkonzentrate (gGK) enthielten zu ca. 96 % vitale Leukozyten mit sehr guter Funktionalität. Ca. 96 % der analysierten Granulozyten phagozytierten die FITC-*E.coli* und ca. 99 % setzten nach Stimulation mit opsonisierten *E.coli* Sauerstoffradikale frei und zeigten die, durch die eingesetzte Hydroxyethylstärke, erwartete Leistungssteigerung im Vergleich zum Standard-Granulozytenkonzentrat. Die Phagozytose-Leistung (gemessen an der Menge der phagozytierten

FITC-*E.coli*), die laut wissenschaftlicher Literatur nicht beeinflusst werden sollte [95; 80; 96], wies durch die angewandte Aufreinigungsmethode eine kleine, jedoch nicht signifikante Reduktion auf. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt könnte die durch Szépfalusi et al. beschriebene Beobachtung bei Monozyten geben, die FITC-markierte Hydroxyethylstärke nach Inkubation in Phagozyten durchflusszytometrisch nachweisen konnten [97].

Neben den positiven Ergebnissen bei den Leukozyten konnte durch das entwickelte Verfahren eine mit 98,6 % hochsignifikante Depletion der Erythrozyten und eine Reduktion der Thrombozyten um ca. 94 % im gereinigten Granulozytenkonzentrat erzielt werden.

Auf Grundlage der sehr guten Ergebnisse aus den Downscaling-Versuchen wurde die Aufreinigungsmethode mittels HES-Sedimentation mit anschließenden Waschschritten durch Upscaling-Experimente weiterentwickelt. Hierfür wurden in einem ersten Schritt die Sedimentation direkt im Spendenbeutel und die anschließende Waschung in Zentrifugenröhrchen durchgeführt (Vgl. 4.2.2). Innerhalb dieser Entwicklungsstufe wurden insgesamt 11 Standard-Granulozytenkonzentrate aufgereinigt. Die guten Depletionsraten von Erythrozyten (~99 %) und Thrombozyten (~95 %) konnten auch in dieser Phase der Aufreinigungsmethode reproduziert werden. Außerdem konnten ca. 68 % der Leukozyten aus dem Standard-Granulozytenkonzentrat rückgewonnen werden.

Der Verlust an neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den Reagenzglas-Versuchen lässt sich möglicherweise durch die, in der Literatur beschriebene gesteigerte Neigung zur Adhäsion an Fremdmaterial erklären. Dabei sollte aber auch in Betracht gezogen und objektiv beurteilt werden, ob diese adhären und somit stark aktivierten Granulozyten (verminderte Komplementaktivierung, erhöhte Oxyburst-Leistung, stärkere Expression von CD 11b als Fibrinogen-Rezeptor) in Hinblick auf eine spätere Lagerung des gereinigten Granulozytenkonzentrates von Vorteil wären [98; 99; 100; 101].

Auch das manuelle Abpressen des leukozytenhaltigen Sedimentationsüberstandes beinhaltet einen möglichen Verlust an Granulozyten. Da das Erythrozytensediment sehr instabil ist, kommt es leicht zu minimalen Aufwirbelungen der Erythrozyten an der Trennschicht. Dieser Bereich wurde in Hinblick auf die angestrebte sehr gute Reduktion der roten Blutzellen nicht mit überführt, sondern verblieb beim Pellet, das im Anschluss verworfen wurde.

Die Vitalität der gewonnenen Leukozyten im gereinigten GK lag bei 90 %. In den durchgeführten Analysen konnten die sehr guten Funktionalitätswerte der Granulozyten aus den Downscaling-Versuchen bestätigt werden. Zusätzlich wurde die Abnahme der Phagozytose-Leistung deutlich minimiert.

Um eine spätere Herstellung der gereinigten Granulozytenpräparate in einer transfusionsmedizinischen Einrichtung und die Anwendung am Patienten ermöglichen zu können, wurden in der letzten Entwicklungsphase insgesamt 16 Standard-Granulozytenkonzentrate im geschlossenen System aufgereinigt (Vgl. 4.2.3). Alle notwendigen Komponenten, wie diverse Leerbeutel zur Gewinnung des Leukozytenüberstandes und Aufnahme des Waschüberstandes,

die Hydroxyethylstärke-Lösung und die 0,9 %ige Kochsalzlösung wurden mittels Sterilkonnektierung oder sterilem Abschweißen dem System angefügt bzw. von diesem entfernt. Da das verwendete HES 200 nicht in Infusionsbeuteln mit passendem Verbindungsschlauch erhältlich ist, wurde im Vorfeld durch die Apotheke der Universitätsmedizin Rostock unter Reinraumbedingungen je 150 ml der HES 200-Lösung in passende Leerbeutel überführt und diese steril verschlossen. Auch die physiologische Kochsalzlösung ist momentan noch nicht mit passenden Verbindungsschläuchen auf dem Markt erhältlich, so dass die verwendeten Infusionsbeutel über einen Dorn mit einer Heidelberger Verlängerung versehen wurden. Dieser Mangel an geeignetem Material könnte in Zukunft z. B. durch Zusammenarbeit mit geeigneten Firmen zur Verfügung gestellt werden.

Die im geschlossenen System aufgereinigten Granulozytenkonzentrate enthielten $21,2 \times 10^9$ Leukozyten, dies entsprach ca. 68 % der Ausgangszellzahl im Standard-Granulozytenkonzentrat. Der Anteil vitaler Leukozyten konnte durch die Prozessierung auf 92 % signifikant verbessert werden. Ca. 73 % ($17,3 \times 10^9$) der neutrophilen Granulozyten konnten im gGK nachgewiesen werden und bildeten somit die am stärksten enthaltene Subpopulation (82 %). Die Wiederfindungsraten von Lymphozyten und Monozyten lagen bei 34 % ($10,5 \times 10^9$) und 70 % ($2,7 \times 10^9$). Die (hoch-) signifikante Abreicherung von Erythrozyten (ca. 99 %) und Thrombozyten (ca. 94 %) konnte auch im geschlossenen System reproduziert werden (Vgl. 4.2.3.1).

Bereits in den späten 1990er Jahren veröffentlichten unterschiedliche Arbeitsgruppen Methoden zur Erythrozytendepletion aus Granulozytenpräparaten mittels Sedimentation nach Zugabe von Hydroxyethylstärke. 1997 beschrieben Wuest und Reich die Entfernung von AB0-inkompatiblen roten Blutzellen aus 11 unstimulierten Granulozytenpräparaten, in dem sie die Sedimentation im umgedrehten Spendenbeutel durchführten und das Erythrozytensediment nach unten in einen Leerbeutel ablaufen ließen. Die Ausbeute an Granulozyten lag bei knapp 95 %. Zusätzlich enthielten die finalen Präparate noch 12 % der Erythrozyten und 100 % der Thrombozyten aus den ursprünglichen Apheresaten [102]. Ein Jahr später unterzogen Adkins et al. 10 G-CSF stimulierte Granulozytenkonzentrate einer einstündigen HES-Sedimentation in einem Plasmaextraktor mit anschließendem Abdrücken des Überstandes nach oben. Dabei dokumentierten sie einen signifikanten Rückgang der Granulozytenzellzahl auf 80 % des Ausgangswerts und eine nicht signifikante Reduktion des Erythrozytenvolumens von 25 ml auf 6,3 ml im Endpräparat. Außerdem enthielt das manipulierte Granulozytenkonzentrat noch 81 % der ursprünglichen Thrombozytenmenge [103]. Bryant et al. beschrieben 2010 das erste Verfahren zur Erythrozytenreduktion bei Standard-Granulozytenkonzentraten mittels einfacher Sedimentation ohne Zugabe weiterer Hydroxyethylstärke. Durch diesen vierstündigen Prozess konnten 80 % der Granulozyten, 75 % der Monozyten und ebenfalls 80 % der Lymphozyten aus dem Ursprungs-GK gewonnen werden. Außerdem konnten 92 % der Erythrozyten entfernt werden. Auch hier wurde nach der Sedimentation noch ein sehr hoher Anteil an Thrombozyten (81 %) im gereinigten Granulozytenkonzentrat festgestellt [83].

Was alle drei vorherigen Methoden gemeinsam haben, sie aber deutlich von dem in dieser Dissertation weiterentwickelten Verfahren unterscheidet, ist unter anderem das Fehlen der zusätzlichen Waschschr tte mit physiologischer Kochsalzlösung. Dadurch konnte zum einen der hohe Gehalt an Thrombozyten, der für eine spätere Lagerung des gereinigten Granulozytenkonzentrates mögliche negative Einflüsse haben könnte, signifikant reduziert werden. Zum zweiten wurde die momentan stark diskutierte Hydroxyethylstärke, die bei einer möglichen Transfusion unerwünschte Nebenwirkungen im Patienten verursachen könnte, entfernt. Die in dieser Forschungsarbeit beschriebene deutlich bessere Reduktion der Erythrozyten könnte ebenfalls ein Resultat der zusätzlichen Waschschr tte sein. Die damit verbundene etwas geringere Ausbeute an neutrophilen Granulozyten wurde in Hinblick auf eine bessere Verträglichkeit durch den Patienten toleriert.

Außerdem machten die Arbeitsgruppen um Wuest und Reich, Adkins und Bryant keine Angaben zur Vitalität und Funktionalität der Granulozyten, zur Expression von Zelloberflächenmolekülen oder zur Zytokinfreisetzung. Auch eine Einschätzung der Methode hinsichtlich Zellschädigung mittels geeigneter Marker (Laktatdehydrogenase (LDH)-Konzentration, Elastasefreisetzung) wurde nicht aufgeführt [102; 103; 83].

In dieser Dissertation konnte an Hand der signifikant reduzierten LDH-Konzentration nachgewiesen werden, dass die entwickelte Aufreinigungsmethode im geschlossenen System zellschonend durchführbar ist (Vgl. 4.2.3.2). Da der gesamte Plasmaanteil des Standard-Granulozytenkonzentrates während der Prozessierung verworfen und durch neues blutgruppenidentisches CPD-Plasma ersetzt wurde, lässt sich ein Verdünnungseffekt bei der LDH-Konzentration nicht von der Hand weisen. Da die Zellsuspensionsprobe für die LDH-Bestimmung jedoch erst abgenommen wurde, nachdem es nach der Resuspension der gereinigten Leukozyten zu einem längeren (ca. 1 Stunde) Leukozyten-Plasma-Kontakt kam, hätte die Freisetzung von Laktatdehydrogenase durch geschädigte Zellen die Konzentration im Plasma des gGK im Vergleich zum Resuspensionsplasma erneut ansteigen lassen. Da dieser Fall nicht eintraf, lässt sich postulieren, dass die Aufreinigungsmethode zellschonend ist.

Zur Granulozytenfunktion lässt sich sagen, dass durch die Aufreinigung mittels HES-Sedimentation der sehr hohe Anteil an phagozytierenden bzw. Oxyburst-aktiven Granulozyten nicht beeinflusst wurde. Auch der geringe nicht signifikante Verlust der Phagozytose-Leistung und die Zunahme der ROS-Freisetzung zeigten keine Veränderungen zu den Resultaten der Upscaling-Versuchen und wurden somit bestätigt (Vgl. 4.2.3.3). Erklärungen für die nachgewiesene Leistungsabnahme der Phagozytose bzw. Leistungssteigerung des Oxyburst wurden bereits bei den Downscaling-Versuchen diskutiert.

Auch durch die Analyse verschiedener Oberflächenmoleküle konnte eine geringfügige Beeinflussung des Phänotyps festgestellt werden. Sowohl der prozentuale Anteil exprimierender

Granulozyten als auch die entsprechenden Expressionsraten, gemessen an der mittleren Fluoreszenzintensität, wiesen nur minimale Veränderungen durch den Aufreinigungsprozess auf (Vgl. 4.3.5.4). Die minimal stärkere Expression der $\beta 2$ -Integrin-Untereinheiten CD11b und CD11c bestätigen die leichte Voraktivierung der Granulozyten durch die Stimulation mit G-CSF [104] und den intensiveren Kontakt zum Fremdmaterial des Beutelsystems [100]. Eine mögliche Erklärung für die Hochregulierung des monozytären/myeloiden LPS-Rezeptor CD14 könnte im Kontakt mit dem HES liegen. Szépfalusi et al. beschrieben die Phagozytose von FITC-markierter Hydroxyethylstärke durch kultivierte humane Monozyten [97]. Die Folge wäre eine Aktivierung der Zellen und die damit verbundene Freisetzung von TNF- α , welches wiederum die CD14-Expression induzieren und erhöhen würde [105]. Der beschriebene Effekt könnte auch die Hochregulierung von CD11b erklären, da CD11b nach Inkubation mit niedrigen Dosen von LPS ebenfalls stärker exprimiert wird [106].

Bei der Analyse der Plasmakonzentrationen von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ und TNF- α zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Bei IL-1 β , IL-6 und IL-8 kam es zur Abnahme der Zytokinkonzentration nach der Aufreinigung, die sich aber durch einen Verdünnungseffekt beim Resuspendieren der gereinigten Leukozyten erklären ließe. Lediglich bei TNF- α wurde eine Erhöhung der Plasmakonzentration auf das Doppelte verzeichnet. Auch hier könnte die bereits beschriebene Aktivierung der Granulozyten und Monozyten durch die verwendete Hydroxyethylstärke eine mögliche Erklärung sein, da diese zur Sekretion von TNF- α ins umgebende Plasma führt [105; 106].

5.3 Lagerung von gereinigten Granulozytenkonzentraten bis zu 72 Stunden möglich

Bereits seit den späten 1960er Jahren beschäftigen sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Lagerung humaner Granulozyten und den damit verbundenen Einflüssen auf deren Funktionalität. Die publizierten Studien und darin beschriebenen Experimentansätze unterscheiden sich dabei jedoch in einer Vielzahl von Details.

So wurde in einigen Studien mittels konventioneller Venenpunktion gewonnenes Vollblut direkt gelagert [107; 108; 109; 110]. Andere Arbeitsgruppen nutzen Blutprodukte, wie gewaschene Buffy Coats [111] oder Apheresate aus Filtration [110; 108] bzw. kontinuierlicher [110] und diskontinuierlicher Hämapherese [108], die eine teils reduzierte Menge an Erythrozyten und Thrombozyten enthielten. Unterschiede gab es ebenfalls bei den getesteten Temperaturen, bei denen die verwendeten Blutpräparate aufbewahrt wurden. Alle Lagerungen wurden zwischen 4 bis 6 °C im Kühlschrank durchgeführt [107; 110; 108; 109; 111]. Nur wenige Forschungsgruppen, wie Lane et al., Hammer et al. und McCullough et al. untersuchten zusätzlich die Funktionalität humaner Granulozyten bei Raumtemperatur und bei 37 °C [110; 109; 111] und den Einfluss von kontinuierlicher Bewegung während der Lagerungsphase [110]. Als Testparameter zur Einschätzung der Lagerungsbedingungen wurden in den meisten Studien die Gesamtzellzahl, die

Vitalität, die Phagozytose- und Oxyburstrate, die Chemotaxis und die bakterizide Abreicherungsrate über einen Zeitraum bis teilweise 96 Stunden ermittelt und ausgewertet. In einigen Publikationen wurden zusätzlich noch der pH-Wert und der Glucoseverbrauch bestimmt [110; 108].

In allen Studien zeigte sich, dass die Funktionsparameter Chemotaxis, Migration, Oxidativer Burst und bakterizide Abreicherungsrate am stärksten durch die verschiedenen Lagerungsbedingungen beeinflusst wurden. Unabhängig von der Herstellungsmethode reduzierten sich das chemotaktische Verhalten, die Migrationsrate und die Oxidative Burstrate der Granulozyten zwischen 24 und 48 Stunden bei den bei 4 °C gelagerten Blutprodukten deutlich. Bei den bei Raumtemperatur gelagerten Leukozyten blieben diese Parameter unbeeinflusst. [107; 110; 111]. Durch alle fünf Studien wurde beschrieben, dass die Gesamtzellzahl an Leukozyten bzw. Granulozyten, die Vitalität und die Phagozytoserate über einen Zeitraum von 24 bis teilweise 96 Stunden unabhängig von Temperatur (4 °C und Raumtemperatur) und Herstellungsmethode (Venenpunktion und Hämapherese) stabil blieb [107; 110; 108; 109; 111]. McCullough et al. zeigten bereits 1969 anhand von mikroskopischen Aufnahmen, dass es während der Lagerung vermehrt zu morphologischen Veränderungen hinsichtlich beginnender Apoptose bei den Granulozyten kam [107]. McCullough et al. und Hammer et al. konnten unabhängig voneinander nachweisen, dass von einer Leukozytenlagerung bei 37 °C [110; 109] oder einer kontinuierlichen Agitation während dieser Zeit im Hinblick auf alle getesteten Parameter abzusehen ist [110].

Auf Grund des stark reduzierten chemotaktischen Verhaltens und der Migration in vivo der Granulozyten durch eine längerfristige Lagerung, empfehlen die meisten Forschergruppen eine schnelle Transfusion der Granulozyten innerhalb der ersten 24 Stunden [109; 110; 111].

Bis heute sind laut den geltenden gesetzlichen Regularien in Deutschland und den USA Standard-Granulozytenkonzentrate zur umgehenden Transfusion bestimmt oder sollten maximal 24 Stunden bei 22 ± 2 °C unbewegt gelagert werden [23; 112]. Beide Richtlinien machen dabei aber keine Vorgaben zu Zellkonzentrationen, Lagerungsbeutel und Lagerungsmedium.

Zusätzlich verweisen neuere Studien auf verschiedene, durch Erythrozyten, Thrombozyten und deren Lagerung hervorgerufene, negative Auswirkungen auf neutrophile Granulozyten, so dass eine signifikante Reduktion dieser beiden Blutzelltypen, wie sie durch die in dieser Dissertation beschriebene Aufreinigungsmethode erreicht wurde, vorteilhaft wäre. Bereits 1998 beschrieben Chin-Yee et al., dass es während der Lagerung von nicht leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten zu einer Akkumulation von bioreaktiven Substanzen (Histamin, Lipide, Zytokine, Komplement) im Plasmaüberstand kam. Die damit einhergehende starke Aktivierung der neutrophilen Granulozyten führte zu einer Expressionserhöhung der Oberflächenmarker CD11b und CD16, einer verstärkten Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Oxyburst) und Sekretion der Zytokine Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor (TNF)- α [113].

Auch die bevorzugte Lagerungstemperatur von Erythrozyten (1-6 °C) und die kontinuierliche Agitation von Thrombozytenkonzentraten führen zu einer beschleunigten Apoptose in Leukozyten

[114; 115]. Zusätzlich werden während der Lagerung von Erythrozyten sogenannte „*storage vesicles*“ (Lagerungsversikel) freigesetzt. Diese werden von Neutrophilen phagozytiert, so dass es ebenfalls zu einer Aktivierung und damit erhöhten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen kam [116].

Mit der Einführung des rekombinanten humanen Granulozyten-Wachstumsfaktor („*Granulocyte colony-stimulating factor*“, G-CSF) im Jahre 1993 als Stimulans, das den Spender vorab induziert werden kann, wurde eine neue Möglichkeit geschaffen, höhere Gesamtzellzahlen an funktionstüchtigen Neutrophilen während einer Apherese zu gewinnen und somit effektive Granulozytenkonzentrat-Transfusionen zur Behandlung von neutropenen Patienten durchführen zu können. Eine Vielzahl von Studien beschrieben aber im Laufe der Zeit, dass die in vivo Applikation von G-CSF und/oder Dexamethason zu Funktionsveränderungen bei den Granulozyten führen kann. So konnten die Autoren zeigen, dass die Chemotaxis der Zellen und die Expression von CD62L (vermittelt die Adhäsion zwischen Granulozyten und Endothelzellen) minimal vermindert war, sie aber weiterhin in der Lage waren zu migrieren [117; 118; 62]. Zusätzlich wurden die Phagozytose- und Oxyburst- und die Adhärenz zu Plastikmaterialien gesteigert. Die G-CSF-Behandlung verstärkte auch die Expression einer Vielzahl von Oberflächenmarkern, wie die Komplement-Rezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und CR1 (CD35), die IgG-Rezeptoren FcγRI (CD64) und FcγRII (CD32) und der Lipopolysaccharid-Rezeptor (CD16). Gleichzeitig verringerte sich durch die Konditionierung der Spender die Apoptoserate der Zellen und die Expression des „Todes-Moleküls“ FasR (CD95) [119; 120; 121; 122; 62; 123].

Auf Grundlage der in der Fachliteratur beschriebenen lebenszeitverlängernden Einflüsse von G-CSF und Dexamethason auf die Granulozyten, und dass die für diese Dissertation verwendeten Präparate nach Spenderkonditionierung mit den genannten Medikamenten gewonnen wurden, ließ sich eine mögliche Lagerung der gereinigten Granulozytenkonzentrate bei geeigneten Bedingungen vermuten. Da es durch die Aufreinigung der GKs zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahl an Erythrozyten und Thrombozyten, und somit zu einer stark veränderten zellulären Zusammensetzung der zu lagernden Leukozytenpräparate/Granulozytenkonzentrate wurden während der praktischen Forschungsarbeiten für diese Dissertation neben den Richtlinien-Parameter auch literaturbeschriebene Einflussgrößen untersucht.

Bei den Untersuchungen zur Lagerungstemperatur (Vgl. 4.3.1) und zur kontinuierlichen Bewegung während der Lagerung (Vgl. 4.3.2) wurde festgestellt, dass sich die Vorgaben für die Aufbewahrung von Standard-Granulozytenkonzentraten (Raumtemperatur, keine Agitation) ebenfalls auf die gereinigten Präparate adaptieren lassen.

Sowohl die Leukozyten-Gesamtzellzahl, als auch der Anteil Oxyburst-aktiver Granulozyten und deren Menge an freigesetzten Sauerstoffradikalen als Reaktion auf die dargebotenen opsonisierten *E.coli* waren bei Raumtemperatur über die gesamten 72 Stunden deutlich besser als bei der 4 °C-Lagerung. Die Vitalität und die Phagozytoserate wiesen hingegen keine

Temperaturabhängigkeit auf. Von einer Lagerung von gereinigten Granulozytenkonzentraten bei 37 °C ist auf Grund der schlechten Zellzahlen, Vitalitäten und Funktionsparametern dringend abzuraten. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass bei G-CSF-stimulierten Granulozytenkonzentraten durch Raumtemperatur-Lagerung die Funktionalität (Chemotaxis, Phagozytose, Oxyburst) über einen längeren Zeitraum (48 bis 72 Stunden) konservierbar ist [124; 125; 126; 127; 128; 117]. Jedoch war eine Übertragung diese Erkenntnisse auf dieses Dissertationsvorhaben nicht zu 100 % möglich, da in der erwähnten Fachliteratur Blutpräparate als Untersuchungsmaterial verwendet wurden, die in ihrer zellulären Zusammensetzung eher einem Standard-Granulozytenkonzentrat oder gepoolten Buffy Coats entsprochen haben. Lediglich Bashir et al. und Mochizuki et al. konnte durch ihre Prozessierung der gepoolten Buffy Coats bzw. des G-CSF-stimulierten Vollbluts (Resuspension in Thrombozyten-Additivlösung (nur Bashir et al.), Zentrifugation und Abtrennen der granulozytenhaltigen Schicht) Erythrozyten und Thrombozyten reduzierte Präparate erzeugen, die den gereinigten Granulozytenkonzentraten am nächsten kam. Ihre Ergebnisse im Hinblick auf Gesamtzellzahl, Phagozytose und Oxyburst unterstützen somit die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse aus den Vergleichsversuchen zum Lagerungsparameter „Temperatur“ [129; 130].

Bei den Untersuchungen, ob eine kontinuierliche Agitation der Lagerungsansätze von Vorteil ist (Vgl. 4.3.2), da so eine Aktivierung der restlichen Thrombozyten und eine gleichzeitige Stimulation der Granulozyten durch aktivierte Blutplättchen inhibiert wird, zeigte sich, dass es über den gesamten Zeitraum zu einem stärkeren Verlust an Leukozyten in den bewegten Lagerungsansätzen kam. Die Vitalität der weißen Blutzellen wurde dabei aber nicht beeinflusst. Grund für diese Beobachtung könnten zum einen die Ablagerungen der Leukozyten in den Spritzenports der Lagerungsbeutel (siehe Abb. 31) sein. Zum anderen kann es aber auch ein Hinweis auf eine stärkere Belastung der Leukozyten durch die ständige Bewegung sein. Hierfür würden auch die zu jedem Zeitpunkt höher gemessenen Laktatdehydrogenase (LDH)-konzentration im Plasma sprechen. Identische Ergebnisse und Schlussfolgerungen zur Leukozyten-Gesamtzellzahl, Vitalität und LDH-Konzentration erzielten auch Eriksson et al. als sie Buffy Coats über 48 Stunden mit und ohne kontinuierliche Bewegung lagerten. Außerdem konnten sie durch die Messung von Elastase (zusätzlicher Parameter für die Schädigung von Granulozyten) die Begründung untermauern, dass es durch die stetige Agitation während der Lagerung zur Schädigung der Leukozyten/Granulozyten kommt [125]. Der Anteil an phagozytierenden und Oxyburst-aktiven Granulozyten zeigte sich unabhängig von einer stetigen Bewegung während der Lagerung. Lediglich die Leistung beider Parameter war bei der Lagerung ohne Bewegung etwas besser. Funktionsanalysen der Granulozyten wurden durch Eriksson et al. nicht durchgeführt.

Die in dieser Dissertation aufgereinigten und teilweise gelagerten Leukozyten/Granulozyten sollen in Zukunft für die Anwendung am Patienten in der Humanmedizin bestimmt sein. In den letzten Jahren konnte anhand einer Vielzahl von publizierten Fallstudien gezeigt werden, dass die Transfusion von Spendergranulozyten bei Patienten mit schwerer Neutropenie, mit bakteriellen

oder pilzbedingte Infektionen, die auf eine konventionelle antimikrobielle Behandlung nicht ansprechen, oder als Prophylaxe während der Chemotherapie bei Krebserkrankungen sehr gute Erfolge erzielt haben [131; 132; 133; 134; 135]. In früheren Studien zu Granulozytentransfusionen wurde aber auch beobachtet, dass die Zahl der im Patienten wiedergefundenen Granulozyten direkt mit der Zahl der transfundierten Zellen korreliert, und dass der Erfolg der Therapie ebenfalls davon abhängig ist [42; 33]. Nach den momentan geltenden Empfehlungen sollten einem Neugeborenen minimal $1-2 \times 10^9$ und einem Erwachsenen $1-2 \times 10^{10}$ Granulozyten verabreicht werden [33].

Es stellte sich also die Frage, bei welcher Zellkonzentration eine entsprechend hohe Gesamtzellzahl für eine möglichst gute Vitalität und Funktionalität gelagert werden sollte. In dieser Arbeit wurden hierfür eine niedrige Leukozytenkonzentration von $5 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (Gesamtzellzahl: 2×10^8) gegen eine hohe Konzentration von $1 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ (Gesamtzellzahl: 4×10^9), bei Raumtemperatur unbewegt gelagert, getestet (Vgl. 4.3.3).

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich deutlich, dass es durch die hohe Zellkonzentration zu einem signifikant stärkeren Abfall des pH-Werts über den gesamten Lagerungszeitraum kam. Ein Grund hierfür könnte der gleichzeitig stark angestiegene Partialdruck an Kohlenstoffdioxid (CO_2) sein. CO_2 , das nicht aus dem geschlossenen Plasmabeutel diffundieren kann, verbindet sich mit im Plasma enthaltenem Wasser (H_2O) und bildet Kohlensäure, die wiederum die wässrige Lösung in Protonen (H^+) und Karbonationen (CO_3^-) zerfällt. Die Protonen führen dann zu einer verstärkten Ansäuerung des Lagerungsplasmas. Zusätzlich sind Granulozyten dynamische Systeme und bilden über den gesamten Lagerungszeitraum selbständig Wasserstoffionen. Die durch den niedrigen pH-Wert und den hohen CO_2 -Partialdruck hervorgerufenen unphysiologischen Lagerungsbedingungen verursachten neben signifikant höheren Zellverlusten und geringfügig schlechteren Vitalitäten, auch signifikant höhere LDH-Plasmakonzentration, die für eine erhöhte Zellschädigung sprechen. Hingegen einiger Tiermodellstudien, die eine Inhibierung der Phagozytose- und Oxyburstfunktion von Granulozyten durch erhöhte Laktatkonzentrationen beschrieben [136; 137], konnte eine erhöhte Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch die hochkonzentriert gelagerten Leukozyten verzeichnet werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine Überstimulierung der Granulozyten durch tote Zellen, Zellbestandteile oder Zelldebris sein, die eine unkontrollierte Abgabe von neutrophilen Granula mit gleichzeitiger verstärkter ROS-Freisetzung verursacht [4]. Für eine spätere therapeutische Anwendung könnte dieser Fakt von Nachteil sein, da eine deutlich verstärkte Freisetzung von Sauerstoffradikalen nicht nur zu Abtötung von Pathogenen sondern auch zu Schädigung von gesunden Zellen bzw. Gewebe im Patienten führen könnte. Eine Verschlechterung der Phagozytoserate und -leistung durch die hohen Leukozytenkonzentrationen konnte auf Grund der großen Spannweite der Ergebnisse nur bedingt nachgewiesen werden.

Glasser et al. untersuchten ebenfalls den Effekt verschiedener Zellkonzentrationen und pH-Werte auf die Funktionalität von gelagerten Granulozyten. Auch sie zeigten, dass hohe Zellkonzentrationen zu einer Akkumulation von Wasserstoffionen im Medium und somit in

niedrigen pH-Werten (6,0 bis 6,8) resultieren. Funktionsverluste wurden lediglich für die Chemotaxis beschrieben. Glasser und seine Mitarbeiter postulierten, dass der optimale pH-Wert für die Granulozytenfunktionalität zwischen 7,2 und 7,8 liegen sollte [138]. Gestützt wird diese These durch die Untersuchungen von Lane und Lamkin, die durch die Zugabe von Bikarbonat während der Lagerung von Granulozyten bei 22 °C den pH-Wert normalisieren und somit die Funktionalität erhalten konnten [139; 140].

Da eine Leukozytenlagerung mit hoher Zellkonzentration für die spätere Anwendung in der Humanmedizin und für die Machbarkeit in einer transfusionsmedizinischen Einrichtung unumgänglich ist, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die den pH-Wert während der Lagerung im postulierten Optimum von 7,2 bis 7,8 stabilisieren [138] und den Gasaustausch von CO₂ verbessern. Hilfreich waren dabei die Studienresultate von Eriksson et al., die Buffy Coats in verschiedenen gasdichten und gaspermeablen Blutbeuteln über 48 Stunden lagerten. Sie zeigten, dass durch die Nutzung von gasdurchlässigen Blutbeuteln sowohl das Abfallen des pH-Werts als auch die Anreicherung von CO₂ während der Lagerung signifikant minimiert werden konnte. Durch den ständige Austausch der Blutgase und die stabilisierten pH-Werte konnten somit physiologische Bedingungen geschaffen werden, die sich auch in einer geringeren LDH-Konzentration und Elastasefreisetzung widerspiegeln [125]. Basierend auf den Erkenntnissen von Eriksson et al. wurden für die Lagerung der gereinigten Granulozytenkonzentrate in hoher Zellkonzentration gaspermeable Thrombozytenlagerungsbeutel von Terumo BCT (Garching) anstelle der gasdichten Plasmabeutel von MacoPharma verwendet (Vgl. 4.3.4). Da diese Beutel ein größeres Volumen besaßen, konnte gleichzeitig auch eine größere Gesamtzellzahl an Leukozyten gelagert werden. Die Zellkonzentration pro Milliliter wurde dabei so gewählt, dass sie eine Zellzahl von 5×10^7 Leukozyten nicht überschreitet, da dies zur Erhaltung der Chemotaxis in gelagerten Granulozyten beiträgt [139]. Ähnlich zu den Ergebnissen von Eriksson et al. und Lane und Lamkin konnten durch die Modifikationen der Lagerungsbedingungen die Blutgase und der pH-Wert in physiologischen Wertebereichen über den gesamten Lagerungszeitraum von 72 Stunden stabilisiert werden. Im Rahmen der vorliegenden Forschungsarbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Gesamtzellzahl der Leukozyten, bei gleichbleibend guter Vitalität, auch nach 72 Stunden noch bei 97 % des Ursprungswertes lagen. Außerdem konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Phagozytoseleistung von gereinigten Leukozytenpräparaten durch die Nutzung von gaspermeablen Lagerungsbeuteln während der gesamten Lagerungsperiode signifikant gesteigert werden kann. Ein anfänglich beobachteter Rückgang der Oxyburst-Leistung der gelagerten Granulozyten konnte in folgenden Lagerungsexperimenten (n = 5) nicht mehr nachgewiesen werden (Vgl. 4.3.5).

Wie bereits aus früheren Forschungsergebnissen der Arbeitsgruppe bekannt war und sich auch in den hier diskutierten Ergebnissen bestätigte, kommt es während der Lagerung der gereinigten Granulozytenkonzentrate zu einer unspezifischen Vorstimulation des respiratorischen Burst und damit verbundenen geringen Freisetzung von Sauerstoffradikalen bei den Granulozyten [41]. Der

prozentuale Anteil solch stimulierter Neutrophiler lag bis einschließlich 72 Stunden unter 20 % in den gereinigten GKs. Eine erste Begründung findet sich bereits in der Konditionierung der Spender mit G-CSF und Dexamethason [62; 119]. Weitere Ursachen für diese Voraktivierung können die in der Fachliteratur und im Rahmen dieser Dissertation bereits beschriebene Akkumulation von bioreaktiven Substanzen (Histamin, Lipide, Zytokine, Komplement) im Plasmaüberstand [113] bzw. die Bildung von sogenannten „*storage vesicles*“ (Lagerungsvesikel) bei der Langzeit-Lagerung von Erythrozytenpräparaten liegen [116]. Auch die durch Keating et al. untersuchte Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten während der Lagerung von roten Blutzellkonserven führt zu einer Voraktivierung der Leukozyten, verbunden mit gesteigerter Apoptose und Zellmortalität [141]. Auch der Kontakt mit körperfremden Materialien (z. B. Lagerungsbeuteln) wurde in der Literatur als granulozytenaktivierend beschrieben [142; 101; 99]. Sowohl die Konditionierung des Spenders als auch der Kontakt mit dem Lagerungsbeutel lassen sich nicht vermeiden. Da das für die Lagerung der gereinigten Granulozytenkonzentrate verwendete CPD-Plasma aus Vollblutspenden nach zweistündiger Lagerung hergestellt wurde, und neben den genannten bioaktiven Stoffen noch maximal 5×10^7 Thrombozyten und 6×10^6 Erythrozyten pro Milliliter enthalten könnte [23], sollten diese verschiedenen Substanzen durch die Sterilfiltration entfernt werden (Vgl. 3.6.5 und 4.3.5).

Die in dieser Dissertation weiterentwickelte Aufreinigungsmethode führte zur Herstellung eines innovativen hochreinen Leukozytenpräparats, dessen Lagerfähigkeit noch nicht untersucht und somit in der Literatur beschrieben worden ist. Arbeitsgruppen, wie Wuest et al., Adkins et al. und Bryant et al., die sich ebenfalls mit der Reduktion von Erythrozyten aus Granulozytenkonzentraten beschäftigten, führten im Anschluss an ihre Prozessierung allerdings keine Funktions- oder Lagerungsuntersuchungen an den Neutrophilen durch [102; 103; 83]. So lassen sich die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse am besten mit den erythrozytenreduzierten, granulozytenreichen Blutprodukten von Bashir et al. (gepoolte Leukozytenkomponente aus unstimulierten Buffy Coats [129]), Mochizuki et al. (Granulozytenkonzentrat aus stimulierten Buffy Coats [130]) und Schwanke et al. (1:8 mit autologem Plasma verdünntes GK [126]) vergleichen. In allen drei Publikationen wurden die Blutprodukte bei Raumtemperatur (20 - 24 °C) unbewegt über 72 Stunden (Bashir et al. 64 - 68 Stunden) gelagert.

In Bezug auf die Gesamtzellzahl an Leukozyten ergaben die Untersuchungen zur Lagerung im filtrierten CPD-Plasma nur geringfügige, nicht signifikante Vorteile gegenüber der Nutzung der unfiltrierten Variante. So wurden nach 72 Stunden noch 99 % des Ursprungswerts ermittelt (unfiltriert 95 %). Gestützt werden diese Beobachtungen durch die im Lagerungsüberstand gemessenen LDH-Konzentrationen, die beim filtrierten Plasma deutlich geringer ausfielen und über den gesamten Lagerungszeitraum minimal anstiegen ($p > 0,05$). Der Einwand, dass es durch die Sterilfiltration zu einer entscheidenden Reduktion der Laktatdehydrogenase vor Lagerungsbeginn kam, muss negiert werden, da die Ausgangswerte annähernd identisch waren. Vergleichbare Ergebnisse für die Leukozytenzellzahl (94 %) wurden auch von Schwanke und

seinen Mitarbeitern für die 1:8-verdünnten GKs beschrieben, wohingegen Mochizuki et al. nach 72 Stunden bereits Zellverluste von 15,8 % verzeichneten. Auch die von ihnen gemessenen LDH-Konzentrationen sind deutlich höher und stiegen innerhalb von 72 Stunden signifikant an [126; 130]. Im Vergleich zur Lagerung von Standard-Granulozytenkonzentraten, bei der in der Literatur bereits nach 48 Stunden Zellverluste von bis zu 22 % beschrieben wurden [128], scheint die Aufreinigung der GKs in Kombination mit den gewählten Lagerungsmodalitäten von großem Vorteil zu sein.

Deutliche Unterschiede zwischen den publizierten und im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen sich bei der Vitalität. Sowohl die Arbeitsgruppe von Bashir, als auch die von Mochizuki beschrieben zum Teil signifikante Verluste an vitalen Leukozyten [129; 130]. Auch bei der Lagerung von nicht modifizierten Präparaten wurde dieser Effekt beschrieben [128]. Im Gegensatz dazu stehen die während der Lagerung der gereinigten Granulozytenkonzentrate in unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma ermittelten Werte. In beiden Lagerungsvarianten kam es über 72 Stunden zu einer kontinuierlichen Vitalitätsverbesserung (Endwert: unfiltriert 93 %; filtriert 96 %). Eine mögliche Begründung für diese Beobachtung, in Kombination mit den geringen, aber vorhandenen Zellverlusten, ist der durch Esmann et al. beschriebene Mechanismus der Phagozytose von apoptotischen Zellen durch neutrophile Granulozyten [143]. Auch die Phagozytose von apoptotischen und toten Leukozyten durch Lipoxin-aktivierte Monozyten/Makrophagen ist bereits früher in der Literatur beschrieben [144].

Die Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypanblau-Färbung ist eine traditionelle und in der Wissenschaft etablierte Methode, die kostengünstig und schnell durchführbar ist. Ihr Prinzip beruht auf der Anfärbung toter Zellen nach Verlust der Membranintegrität. Die Nekrose oder auch Onkose (durch Zellschädigungen provozierte Tod) ist verbunden mit einem rapiden Anschwellen des Zytoplasmas und gipfelt in der Ruptur der Zellmembran und dem Austreten der Zellorganellen ins umgebende Milieu [145; 146], und kann deshalb per Trypanblaufärbung sehr gut detektiert werden. Aus der Fachliteratur ist jedoch bekannt, dass Granulozyten auf Grund ihrer kurzen Überlebenszeit von nur wenigen Stunden und zur Regulation inflammatorischer Prozesse spontan in Apoptose gehen können [147; 138]. Dabei zeigen sich typische und gut definierte morphologische Veränderungen wie die Zerstörung der Zytoskelettstruktur, die Kondensierung und Fragmentierung des Zellkerns verbunden mit der Abnahme des Zellvolumens. Letztendlich kommt es zur Bildung von Membranbläschen („*membrane blebbing*“) und dessen Abschnürung sogenannter Apoptosekörperchen („*apoptotic bodies*“) mit Zellinhalt [148]. Sowohl die Plasmamembran der apoptotischen Granulozyten als auch der Apoptosekörperchen bleibt während des gesamten Prozesses intakt und kann so nicht von Trypanblau passiert werden und eine Detektion dieser „sterbenden“ Zellen ist nicht möglich. Neben den mikroskopisch erkennbaren, allgemeinen Charakteristika apoptotischer Zellen, weisen sie auch veränderte Expressionsmuster ihrer Oberflächenmoleküle, wie den Anstieg von CD95 [149; 150], den kennzeichnenden Verlust von CD16 und die Reduktion von CD31, CD50 und CD66, auf

[151; 148]. Zur Abschätzung möglicher Zellschädigungen während der Entwicklung des Aufreinigungsverfahrens und der ersten Testungen der Lagerungsparameter war der Vitalitätstest mit Trypanblau somit geeignet. Für detailliertere morphologische Untersuchungen wurden relevante Oberflächenmarker bestimmt und elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht.

Bei den Analysen der Apoptose-relevanten Oberflächenmarker (CD16 und CD95) zeigte sich für den Prozentsatz exprimierender Leukozyten eine Zeit- und Lagerungsmedium-unabhängige Verteilung. Der Anteil CD95-positiver Leukozyten lag in beiden Lagerungsvarianten deutlich unter 1 %. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), ein Index für die Menge an Molekülen auf der Zelloberfläche, zeigte jedoch, dass es während der Lagerung im unfiltrierten CPD-Plasma zu einem starken Expressionsanstieg von CD95 kam, während der MFI bei der Lagerung im filtrierten Plasma keine Veränderung zeigte. Die Expressionsmenge für CD16 war unabhängig von der Plasmavariante und nahm innerhalb des Beobachtungszeitraums leicht ab (Vgl. 9.6.1 und 9.6.2). Die Ergebnisse scheinen ein Indiz für eine nach 72 Stunden beginnende Apoptose zu sein, müssen aber sehr kritisch betrachtet werden, da die Untersuchung nur einmalig durchgeführt wurde. Ähnliche Ergebnisse zur Expression von CD16 und CD95 erzielten Akaihata et al., die das Granulozytenpräparat von Mochizuki et al. [130] adaptiert und für ihre Untersuchungen genutzt hatten. Sie stellten keine signifikanten Veränderungen bei der Expressionsmenge der beiden Oberflächenmarker fest. Durch die Untersuchung der Granulozyten mittels Annexin V-Markierung konnten sie eine Zunahme des apoptotischen Zellanteils nachweisen [152]. Eine Übertragung dieser oder ähnlicher Methoden [153] auf die Untersuchungen dieser Dissertation wäre von Vorteil gewesen und sollten perspektivisch in Betracht gezogen werden.

Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sollten die mittels Oberflächenmarker-Analyse gefundenen Anzeichen beginnender Apoptose visualisiert werden. Um auch einen Eindruck für das Verhältnis zwischen vitalen und apoptotischen Leukozyten zu bekommen, wurden Übersichtsaufnahmen so angefertigt, dass eine kritische Betrachtung möglich ist. In einer Vielzahl von untersuchten Aufnahmen konnten für die Lagerung im filtrierten CPD-Plasma kaum Anzeichen von Apoptose festgestellt werden. Die Leukozyten der zweiten Lagerungsvarianten wiesen hingegen sowohl apoptotische (Kondensierung des Zellkerns) als auch Merkmale beginnender Nekrose (Anschwellen der Zelle, Membranlöcher) auf. Um eine bessere Identifikation und Unterscheidung der beiden Zelltode zu erzielen, sollte perspektivisch die Propidiumiodid-Färbung genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Beurteilung der Funktionalität der gereinigten und gelagerten Granulozytenkonzentrate die Phagozytose, der respiratorische Burst (Vgl. 4.3.5.2), die Expression verschiedener Oberflächenmarker (Vgl. 4.3.5.4) und die Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Vgl. 4.3.5.5) untersucht. Die Chemotaxis, die in der Literatur als eine der lagerungsfragilsten Funktionen beschrieben wird [154], wurde nicht mit konventionellen Methoden (z. B. Boyden-Kammer-Filtermigration) untersucht, sondern mittels Videomikroskopie nach Zugabe von *E.coli* dokumentiert. Dies sollte für zukünftige Untersuchungen kritisch

hinterfragt und eventuell nachgeholt werden. Es zeigte sich trotz allem, dass auch nach 72 Stunden noch chemotaktisches Verhalten der gelagerten Granulozyten erkennbar war.

Die Phagozytose, eine der Hauptfunktionen von Granulozyten zur Erregerbekämpfung, erwies sich im Verlauf der Experimente als eine sehr stabile Funktion. Auch nach 72 Stunden waren unabhängig vom verwendeten CPD-Plasma noch annähernd 100 % der Granulozyten funktionsfähig und wiesen eine signifikante Leistungssteigerung bezogen auf das frisch aufgereinigte Granulozytenkonzentrat auf. Auch hier schien der Einsatz von filtriertem CPD-Plasma einen funktionserhaltenden und sogar funktionssteigernden Effekt zu haben. Bashir et al. publizierte für den zellulären Anteil und die Phagozytose-Leistung ähnlich gute Werte in Bezug auf den zeitlichen Verlauf [129], wohingegen Schwanke et al. lediglich identische Angaben zum Anteil phagozytischer Neutrophiler macht [126]. Da durch die durchflusszytometrische Analyse nicht geklärt werden kann, ob die dargebotenen FITC-*E.coli* auch wirklich phagozytiert und nicht nur an die Oberfläche gebunden sind, sollten die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Visualisierung und Klärung dienen. Es zeigte sich, dass auch nach 72 Stunden die Pathogene noch vollständig in die Zelle aufgenommen wurden.

Auch der Prozentsatz an oxidierenden Granulozyten wies keine lagerungsbedingten Veränderungen auf und lag nach 72 Stunden bei 100 %. Die bereits in Kapitel 5.2 diskutierte, durch den Prozess der Aufreinigung signifikant erhöhte, intra- und extrazelluläre Freisetzung von Sauerstoffradikalen pro Granulozyt (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) reduzierte sich über den Lagerungszeitraum, aber wies trotzdem noch 125 % des Ausgangswert des Standard-Granulozytenkonzentrates auf. Bei der Oxyburst-Analyse mittels Chemilumineszenz-Technik scheint dieser Vergleich zwischen Standard-GK und gelagertem gGK noch deutlicher, teilweise signifikant auszufallen. Dieser Punkt ist kritisch zu betrachten, da es bei der Messung des Standard-Granulozytenkonzentrates zu einem Quenching-Effekt der emittierten Lichtquanten durch die hohe Anzahl von enthaltenen Erythrozyten kommt. Ein Lösungsvorschlag wäre eine vorgeschaltete Erythrozytenlyse wie beim kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay, die zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander beitragen könnte. Auch während der gesamten Lagerungsdauer ist der spenderabhängige Einfluss anhand der großen Spannweite deutlich erkennbar. Eine Minimierung lässt sich nur durch die Erhöhung der Anzahl durchgeführter Experimente (Stichprobenzahl) erreichen. Die Arbeitsgruppe Bashir untersuchte ebenfalls den prozentualen Anteil oxidierender Granulozyten und deren Leistung. Sie beobachteten einen ähnlichen Leistungsverlauf bei deutlichem Verlust aktiver Granulozyten [129], den auch Mochizuki et al. in ihren Präparaten feststellten [130]. Lediglich Schwanke et al. konnte durch die 1:8-Verdünnung eines Standard-Granulozytenkonzentrates den Anteil oxidierender Granulozyten erhalten. Zu deren Leistung wurden keine Angaben durch die Arbeitsgruppe gemacht [126].

Ein Grund für den sehr guten Erhalt der Funktionalität der gereinigten Granulozytenkonzentrate ist der geringe Abfall des pH-Wertes und die Stabilität der Blutgase während der Lagerung durch den Einsatz des gaspermeablen Thrombozytenlagerungsbeutels. Arbeitsgruppen, die ebenfalls

eine Art gasdurchlässigen Lagerungsbeutel verwendeten, aber mehr Erythrozyten in ihren Blutprodukten enthielten, beschrieben schlechtere pH-Verläufe [129; 126; 130].

Die Untersuchungen zu den Oberflächenmarkern CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD64 und CD89 können nur ein erstes Indiz für den Anteil exprimierender Leukozyten und die Menge exprimierte Moleküle sein, da diese Analyse nur einmalig durchgeführt wurde. Es zeigte sich, dass der prozentuale Anteil exprimierender Zellen unabhängig vom verwendeten Plasma stabil blieb. Veränderungen wurden, unabhängig vom CPD-Plasma, lediglich bei der Menge der Oberflächenmoleküle verzeichnet. Fast alle CD-Marker wurden mit Verlauf der Lagerung mehr oder weniger hochreguliert. Nur der Apoptose-Marker CD16 zeigte einen leichten Rückgang. Die meisten der untersuchten Marker sind für die direkte Erkennung und Bindung von Pathogenen zuständig. Deren Stabilität bzw. Hochregulierung unterstützt somit die Ergebnisse für die stabile Phagozytose- und Oxyburstfunktion. Die Beobachtungen von Akaihata et al. zur Immunophänotypisierung von gelagerten Granulozyten unterstützen die hier vorgestellten Ergebnisse [152]. Trotzdem sollten perspektivisch diese Untersuchungen wiederholt werden.

Da Granulozyten an einer Vielzahl von endzündungsregulatorischen Prozessen beteiligt sind [4], wurden die Plasmakonzentrationen von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ und TNF- α während der gesamten Lagerungsdauer analysiert. Eine Abhängigkeit der Ergebnisse vom verwendeten CPD-Plasma konnte nicht festgestellt werden. Deutliche Konzentrationsanstiege wurden nur für IL-1 β , IL-6 ($p < 0,05$) und IL-8 ($p < 0,05$) festgestellt. Eine Erklärung der signifikanten Anstiege liegt darin, dass trotz Aufreinigung und effektiver Reduktion immer noch eine Vielzahl an Thrombozyten in den gereinigten GKs enthalten ist, und dass diese ebenfalls IL-1 β und IL-8 freisetzen [155]. Diese Beobachtungen decken sich mit den publizierten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die sowohl Standard- als auch modifizierte GKs untersucht haben [128; 126; 130]. IL-1 β , IL-6 und IL-8 sind proinflammatorische Zytokine bzw. Chemokine und stimulieren somit die Granulozytenfunktionen und tragen zu ihrer Erhaltung während der Lagerungsperiode bei. Eine Ursache für die lagerungsabhängige, erhöhte Freisetzung von Zytokinen in den gereinigten Granulozytenkonzentraten könnte der Kontakt zwischen den Leukozyten und den verbliebenen Thrombozyten sein. In der Literatur wurde dieses Phänomen mehrfach untersucht und beschrieben [155; 156]. Um eventuelle Nebenwirkungen zu vermeiden, wäre ein Plasmaaustausch im Vorfeld einer Transfusion ratsam.

Aufgrund der Schwierigkeit, Granulozytenkonzentrate in nennenswerten Mengen zu bekommen (geringe Spendenbereitschaft, ethische Aspekte der GK-Spende, wie die Stimulation des Spenders und die mit der Spende verbundene Entnahme größerer Blutvolumen) konnten nicht alle Experimente mit der aus wissenschaftlicher und statistischer Sicht wünschenswerten Anzahl an Wiederholungen durchgeführt werden. Die (statistische) Auswertung der Ergebnisse sollte daher kritisch betrachtet, und durch die Steigerung der Stichprobenzahl in ihrer Aussagekraft gestärkt werden.

Rückblickend auf die Zielstellungen, konnte im Rahmen dieser Dissertation ein im geschlossenen System durchführbares und folglich transfusionsmedizinisch anwendbares Verfahren zur Herstellung eines hochreinen granulozytenreichen Leukozytenpräparates entwickelt und patentiert werden [157; 158], das es ermöglicht 1×10^{10} Leukozyten in 200 ml filtriertem CPD-Plasma bzw. 2×10^{10} Leukozyten in 400 ml filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden unbewegt in gaspermeablen Blutbeutel zu lagern.

Perspektivisch sollen die gereinigten und gelagerten Granulozytenpräparate in der Humanmedizin als indirekte Behandlung, z. B. in Form einer extrakorporale Therapie (EISS) genutzt werden können, da durch die Lagerbarkeit des notwendigen Zellmaterials ein schnellerer Behandlungsbeginn des Patienten möglich wäre. Auch die direkte Transfusion bei Patienten mit schweren neutropenen Zuständen stellt ein mögliches Anwendungsgebiet dar. Hierfür sind jedoch weitere Untersuchungen zur Gewährleistung der Transfusionssicherheit notwendig.

5.4 Ausblick

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich Ansätze für weitere Untersuchungen mit wissenschaftlichen Fragestellungen.

Um die Lagerbarkeit noch auszubauen, wären Untersuchungen zur Kryokonservierung der gereinigten Granulozytenpräparate denkbar. Die Kryokonservierung zählt momentan zu den in der Wissenschaft etablierten Methoden, um Zellen langfristig lagern zu können. Sie ist aber bei der Lagerung von Granulozyten umstritten [159] und bietet somit großes Forschungspotential.

Da der Prozess der Aufreinigung zeitaufwendig ist, könnte eine Automatisierung, wie sie bereits bei der Gewinnung von mononuklearen Zellen vorhanden ist, zu einer Zeitersparnis und Vereinfachung beitragen.

Auch sollten andere Methoden zur direkten und indirekten Entfernung von Erythrozyten und Thrombozyten im transfusionsmedizinisch notwendigen Ausmaß (größere Volumina, höhere Zellzahlen) recherchiert, untersucht und etabliert werden.

6 Zusammenfassung

Der Mensch ist ständig einer enormen Zahl von pathogenen Erregern verschiedenster Arten (bakteriell, viral und mykotisch) ausgesetzt. Für eine effektive Abwehr dieser exogenen Angriffe bilden die native oder angeborene Immunantwort zusammen mit den Granulozyten und Monozyten eine zentrale Schlüsselstelle. Neutrophile Granulozyten sind auf Grund ihrer Vielzahl verschiedenster Eigenschaften ein Hauptbestandteil bei der Bekämpfung von Pathogenen. Durch ihre Mobilität und die Fähigkeit der Einwanderung in befallenes Gewebe sind sie in der Lage mittels Phagozytose, NETose oder der Freisetzung von Sauerstoffradikalen (Oxidativer Burst bzw. Oxyburst) Erreger vollständig zu eliminieren.

Patienten, die durch Mutationen der Granulozyten, Nebenwirkungen von medikamentösen Langzeitbehandlungen (Immunsuppression durch Glucocorticoide, Chemotherapie), Autoimmunerkrankungen oder Erkrankungen des blutbildenden Gewebes (Leukämien) unter einer Dysfunktion oder an einem Mangel (Granulozytopenie oder Neutropenie) an funktionsfähigen neutrophilen Granulozyten leiden, sind daher einer ständig erhöhten Infektionsgefahr ausgesetzt und benötigen adäquate Behandlungen. Bei Fieber und einer im Blut nachgewiesenen Infektion ist eine kalkulierte Antibiose wichtig, kann aber auch bei anhaltenden Granulozytopenien als Prophylaxe angeboten werden. Eine weitere Therapieoption ist die Gabe des rekombinanten humanen Granulozyten-Wachstumsfaktor („*Granulocyte colony-stimulating factor*“, G-CSF), der eine erhöhte Ausschüttung von reifen Granulozyten aus dem Knochenmark bewirkt. Bei ausbleibendem Therapieerfolg besteht dann noch die Möglichkeit der Transfusion von Granulozytenkonzentraten. Neben dem therapeutischen Bedarf an funktionsfähigen Granulozyten in den verschiedensten medizinischen Bereichen, erhöht sich auch die Nachfrage in den Forschungsbereichen der Medizin, Biologie und der pharmazeutischen Industrie.

Die Herstellung von Granulozytenkonzentraten unterliegt in Deutschland den „Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)“ und wurde im Rahmen dieser Dissertation durch das Fachpersonal des Instituts für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Um Präparate mit therapeutisch wirksamen Dosen zu erzielen, wurden die Spender mit 1,5 µg/kg KG G-CSF (i. v.) und 8 mg Dexamethason oral ca. 8 - 16 Stunden vor der Apherese stimuliert. Zum momentanen Zeitpunkt sind diese Granulozytenapheresate auf Grund ihrer Herstellung mit einer hohen Zahl an Erythrozyten und Thrombozyten „verunreinigt“. Außerdem sind sie nicht lagerfähig und müssen innerhalb von 24 Stunden klinisch eingesetzt werden. Grund hierfür ist nicht nur die generell kurze Lebensspanne von Granulozyten im Blut (ca. 1 Tag) sondern auch eine schnelle und starke Aktivierung der Granulozyten und Monozyten durch unphysiologische Bedingungen, die zu einem erhöhten Ausstoß von schädigenden Sauerstoffradikalen und Enzymen führen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde, unter Berücksichtigung der Hämotherapie-Richtlinien, eine Methode zur Herstellung eines hochreinen, granulozytenreichen, funktionstüchtigen Leukozytenpräparats auf Basis einer Sedimentation mit Hydroxyethylstärke (HES) mit anschließenden Waschschritten mit physiologischer Kochsalzlösung entwickelt, die komplett im geschlossenen Blutbeutelsystem durchführbar ist. Während der Entwicklung dieses Verfahrens wurden verschiedenste Parameter (GK-HES-Verhältnis, HES-Variante, Zentrifugation) getestet und somit die bestmögliche Kombination ermittelt.

Durch diese entwickelte Prozessierung konnten 98,8 % der Erythrozyten ($p < 0,001$) und 93,8 % der Thrombozyten ($p < 0,05$) aus einem Standard-Granulozytenkonzentrat entfernt werden. Die Wiederfindungsrate an Leukozyten lag bei 68,2%, wobei der größte Verlust bei den Lymphozyten verzeichnet wurde. Das gereinigte Granulozytenkonzentrat (gGK) enthielt noch 69,9 % der Monozyten und 72,8 % der Granulozyten aus dem ursprünglichen Präparat. Zusätzlich konnte die Vitalität der gGKs im Vergleich zum Standardprodukt signifikant verbessert und somit eine Qualitätsoptimierung erreicht werden. Anschließende Funktionsanalysen ergaben, dass annähernd 100 % der im gereinigten Präparat enthaltenen Granulozyten und Monozyten aktiv Phagozytose und Oxyburst betrieben.

Auf Basis der neu erzielten Reinheit des prozessierten Granulozytenkonzentrates wurde unter der Testung und Kombination unterschiedlichster Parameter (Temperatur, Bewegung, Lagerungssystem und -medium, Zellkonzentrationen) die bestmögliche Lagerungsvariante ermittelt. Eine unbewegte Lagerung der gereinigten Granulozyten in 200 bzw. 400 ml filtriertem CPD-Plasma bei Raumtemperatur in einem gaspermeablen Blutbeutel (z.B. Thrombozytenlagerungsbeutel) verlängert die Haltbarkeit von 24 auf 72 Stunden. Dabei sollte eine Leukozytenkonzentration von $5 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ nicht überschritten werden. Unter Berücksichtigung des im Rahmen dieser Dissertation entwickelten Verfahrens konnten die physiologischen Bedingungen so geschaffen werden, dass die Lagerung von gereinigten Granulozytenkonzentraten mit therapeutisch wirksamen Gesamtzellzahlen ermöglicht. Die entsprechend gelagerten Granulozyten weisen über den gesamten Zeitraum keinen Verlust an Lebensfähigkeit (Vitalität nach 72h: 96%) und an sehr guter Phagozytose- und Oxyburstfunktionalität auf.

Das hier entwickelte und vorgestellte Aufreinigungs- und Lagerungsverfahren ist mit allen notwendigen Arbeitsschritten in einem geschlossenen Beutelsystem mit vergleichsweise geringem Zeit- und Kostenaufwand durchführbar. Eine perspektivische Etablierung der gesamten Methode in einer transfusionsmedizinischen Einrichtung und eine therapeutische Nutzung in der Humanmedizin (extrakorporal oder als Transfusion) sollten nach eingehender Prüfung der Produktsicherheit möglich sein.

7 Literaturverzeichnis

- [1]. Hämatopoese. [Online] Wikipedia, Februar 02, 2014.
- [2]. **Borregaard, N, et al.** Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol.* Oktober 1993, 51, pp. 187-198.
- [3]. **Junqueira, J. C. and Carneiro, J.** *Histologie - Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie.* 4. s.l. : Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 1996. ISBN 978-3-662-07781-8.
- [4]. **Egger, Gerd.** *Die akute Entzündung - Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der unspezifischen Immunität.* 1. s.l. : Springer Wien New York, 2005. ISBN 978-3-211-24491-3.
- [5]. **Dengler, J. and Dreger, P.** Bildung, Aufbau, Funktion und Kinetik hämatopoetischer Zellen. [book auth.] V. Kiefel. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie - Grundlagen, Therapie, Methodik.* 4. s.l. : Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2010.
- [6]. **Witko-Sarsat, V., et al.** Neutrophils: molecules, function and pathophysiological aspects. *Lab Invest.* 200, 80, pp. 617-653.
- [7]. **Galligan, C. and Yoshimura, T.** Phenotypic and functional changes of cytokine-activated neutrophils. [book auth.] M. A. Cassatella. *The Neutrophil. Chem Immunol Allergy.* Basel : Karger, 2003, pp. 24-44.
- [8]. **Cassatella, M. A.** Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol.* 1999, 73, pp. 369-409.
- [9]. **Zurier, R. B. and Sayadoff, D. M.** Release of prostaglandins from human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation.* 1975, 1, pp. 93-101.
- [10]. **Goldstein, I. M., et al.** Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 1978, 148, pp. 787-792.
- [11]. **Ford-Hutchinson, A. W., et al.** Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature.* 1980, 286, pp. 264-265.
- [12]. MEDI-LEARN Für Medizinstudenten, Bewerber & junge Ärzte. [Online] MEDI-LEARN Kiel. <http://www.medi-learn.de/>.
- [13]. **Janeway, C. A., et al.** *Immunologie.* 7. s.l. : Spektrum Akademischer Verlag, 2009. ISBN: 978-3-827420473.
- [14]. **Sabroe, I., et al.** Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocytes lipopolysaccharide response. *J Immunol.* 2002, 168, pp. 4701-4710.
- [15]. **Brinkmann, V., et al.** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004, 303, pp. 1532-1535.
- [16]. **Clark, S. R., et al.** Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007, 13, pp. 463-469.
- [17]. **Urban, C. F., et al.** Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology.* 2006, 8, pp. 668-676.
- [18]. **Hampton, M. B., Kettle, A. J. and Winterbourn, C. C.** Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood.* 1998, 92, pp. 3007-3017.
- [19]. **Babior, B. M.** The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest.* 1984, 73, pp. 599-601.

- [20]. **Asano, S.** Human granulocyte colony-stimulating factor: its basic aspects and clinical applications. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1991, 4, pp. 400-413.
- [21]. **Bux, J.** Immunreaktionen gegen neutrophile Granulozyten. [Buchverf.] V. Kiefel. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie - Grundlagen, Therapie, Methodik.* 4. Rostock : Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2010.
- [22]. **Herold, G.** *Innere Medizin.* s.l. : Gerd Herold Verlag, 2012. ISBN: 978-3981466010.
- [23]. **Bundesärztekammer.** Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) - 2. Richtlinienanpassung. s.l. : Deutscher Ärztekammerverlag, April 2010.
- [24]. **Illerhaus, g., et al.** Treatment and prophylaxis of severe infections in neutropenic patients by granulocyte transfusions. *Ann Hematol.* 2002, 81, pp. 273-281.
- [25]. **Dignani, M. C., et al.** Treatment of neutropenia-related fungal infections with granulocyte colony-stimulating factor-elicited white blood cell transfusions: a pilot study. *Leukemia.* 1997, 11, pp. 1621-1630.
- [26]. **Liles, W. C., et al.** A comparative trail of granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone, separately and in combination, for mobilization of neutrophils in the peripheral blood of normel volunteers. 1997, 37, S. 182-187.
- [27]. **Heuft, H.G., et al.** A dose-response analysis of lenograstim plus dexamethasone for neutrophil mobilization and collection. *Transfusion.* 2005, 54, pp. 604-612.
- [28]. **Kelly, K. H. and Bierman, H. R.** The continuous flow separation of leukocytes from human blood. *Am J Med Sci.* 1960, 240, pp. 438-446.
- [29]. **Leitner, G., et al.** Preparation of granulocyte concentrates by apheresis. *Vox Sanguinis.* 2010, 98, pp. 567-575.
- [30]. **Freireich, E J, et al.** Transfusion of granulocytes from donors with chronic myelocytic leukemia to leukopenic recipients. 1962, 41, p. 1359.
- [31]. **Morse, E E, Freireich, E J and Carbone, P P.** The transfusion of leukocytes from donors with myelocytic leukemia to patients with leukopenia. 1966, 6, pp. 183-192.
- [32]. **Cesaro, S., et al.** Granulocyte transfusions from G-CSF-stimulated donors for the treatment of severe infections in neutropenic pediatric patients with onco-hematological diseases. *Support Care cancer.* 2003, 2.
- [33]. **Vamvakas, E. C. and Pineda, A. A.** Meta-analysis of clinical studies of the efficacy of granulocyte transfusions in the treatment of bacterial sepsis. *Journal of Clinical Apheresis.* 1996, 11, pp. 1-9.
- [34]. **Bux, J., et al.** Tolerance of granulocyte donors towards granulocyte colony-stimulating factor stimulation and of patients towards granulocyte transfusion: results of a multicentre study. *Vox Sang.* 2003, 85, pp. 322-325.
- [35]. **Price, T.H., et al.** Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2000, 95, pp. 3302-3309.
- [36]. **Nichols, W. G., Price, T. and Boeckh, M.** Cytomegalovirus infections in cancer patients receiving granulocyte transfusions. *Blood.* 2002, 9, pp. 3483-3484.
- [37]. **Sachs, U. J. and Bux, J.** TRALI after the transfusion of cross-match-positive granulocytes. *Transfusion.* 2013, 12, pp. 1683-1686.
- [38]. **Lanzer, G.** *Kompendium der klinischen Transfusionsmedizin.* s.l. : Springer-Verlag Wien New York, 2010. ISBN: 978-3-211-89850-5.

- [39]. **Altrichter, J., et al.** Extracorporeal cell therapy of septic shock patients with donor granulocytes: a pilot study. *Critical Care*. 2011, 15.
- [40]. **Pietersz, R.** Quality assurance and quality control in component preparation. *Vox Sang*. 1994, 67, pp. 197-199.
- [41]. **Lübcke, A.** Herstellung eines Leukozytenkonzentrates aus buffy coats. [Inauguraldissertation]. Rostock : s.n., 2013.
- [42]. **Strauss, R.G.** Therapeutic granulocyte transfusions in 1993. *Blood*. 81, pp. 1675-1678.
- [43]. **Gupta, A., et al.** Effect of different intravenous iron preparations on lymphocyte intracellular reactive oxygen species generation and subpopulation survival. *BMC Nephrol*. 2010, 17, pp. 11-16.
- [44]. **Maltesen, H.R., et al.** Methylprednisolone prevents tumor necrosis factor-alpha-dependent multinucleated giant cell formation. *Rheumatology (Oxford)*. 2010, 49, pp. 2037-2042.
- [45]. **Lampé, R., et al.** Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2015, 107, pp. 26-30.
- [46]. **Mortaz, E., et al.** Cigarette smoke induces CXCL8 production by human neutrophils via activation of TLR9 receptor. *Eur Respir J*. 2010, 36, pp. 1143-1154.
- [47]. **Pál, L., et al.** Aliphatic alcohol contaminants of illegally produced spirits inhibit phagocytosis by human granulocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2013, 35, pp. 251-256.
- [48]. **Graw, R.J., et al.** Normal granulocyte transfusion therapy: treatment of septicemia due to gram-negative bacteria. *N.Engl.J.Med*. 1972, 287, pp. 367-371.
- [49]. **Higby, D.J., et al.** Filtration leukapheresis for granulocyte transfusion therapy. Clinical and laboratory studies. *N.Engl.J.Med*. 1975, 292, pp. 761-766.
- [50]. **Fortuny, I.E., et al.** Granulocyte transfusion: a controlled study in patients with acute nonlymphocytic leukemia. *Transfusion*. 1975, 15, pp. 548-558.
- [51]. **Alavi, J.B., et al.** A randomized clinical trial of granulocyte transfusions for infection in acute leukemia. *N.Engl.J.Med*. 1977, 296, pp. 706-711.
- [52]. **Herzig, R.H., et al.** Successful granulocyte transfusion therapy for gram-negative septicemia. A prospectively randomized controlled study. *N.Engl.J.Med*. 1977, 296, pp. 701-705.
- [53]. **Vogler, W.R. and Winton, E.F.** A controlled study of the efficacy of granulocyte transfusion in patients with neutropenia. *Am.J.Med*. 1977, 63, pp. 548-555.
- [54]. **Winston, D.J., Ho, W.G. and Gale, R.P.** Therapeutic granulocyte transfusions for documented infections. A controlled trial in ninety-five infectious granulocytopenic episodes. *Ann.Intern.Med*. 1982, 97, pp. 509-515.
- [55]. **Price, T.H.** The current prospects for neutrophil transfusions for the treatment of granulocytopenic infected patients. *Transfu.Med.Rev*. 2000, 14, pp. 2-11.
- [56]. **Hu, Y.** Isolation of human and mouse neutrophils ex vivo and in vitro. *Methods Mol Biol*. 2012, 844, pp. 101-104.
- [57]. **Oh, H., Siano, B. and Diamond, S.** Neutrophil isolation protocol. *J Vis Exp*. 2008, 17, p. 745.
- [58]. **Nauseef, W.N.** Isolation of human neutrophils from venous blood. *Methods Mol. Biol*. 2007, 412, pp. 15-20.
- [59]. **Maqbool, M., et al.** Optimisation of laboratory procedures for isolating human peripheral blood derived neutrophils. *Med J Malaysia*. 2011, 4, pp. 296-299.

- [60]. **Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsmedizin Rostock.** SOP Nr. II.2.7.5.1. (Version-Nr. 2). 2008.
- [61]. **Thoraus, K., et al.** Granulocyte collections: comparison of two apheresis systems. *Transfusion*. 2013, 53, pp. 3262-3268.
- [62]. **Joos, K., et al.** Characterization and functional analysis of granulocyte concentrates collected from donors after repeated G-CSF stimulation. *Transfusion*. 2002, 42, pp. 603-611.
- [63]. **Chatila, T.A., Geha, R.S. and Arnaout, M.A.** Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 1989, 109, pp. 3435-3444.
- [64]. **Naccache, P.H., et al.** Regulation of stimulated integrin expression in human neutrophils by tyrosine phosphorylation. *Blood*. 1994, 84, pp. 616-626.
- [65]. **Zimmermann, F., et al.** Wxpression von elastase on polymorphnuclear neutrophils in vitro and in vivo: identification of CD11b as ligand for the surface-bound elastase. *Shock*. 2005, 23, pp. 216-223.
- [66]. **Starzak, D.E., et al.** Differing cytokine responses by ethnic groups to a bout of exercise.induced muscle damage: a preliminary report. *J Sports Med Phys Fitness*. Feb 18, 2015. (Epub ahead of print).
- [67]. **Zamani, A., et al.** Wrestlers' immune cells produce higher interleukin-6 and lower interleukin-12 and interleukin-13 in response to in vitro mitogen activation. *Iran J Basic Med Sci*. 2014, 17, pp. 917-922.
- [68]. **Sougli, A., et al.** Comparison of inflammatory responses and muscle damage indices following a soccer, basketball, volleyball and handball game at an elite competitive level. *Res Sports Med*. 2015, 23, pp. 59-72.
- [69]. **Luo, Y. and Dorf, M.E.** Isolation of mouse neutrophils. *Curr Protoc Immunol*. Mai 1, 2001, Unit 3.20.
- [70]. **Paoliello-Paschoalato, A.B., et al.** Isolation of healthy individuals' and rheumatoid arthritis patients' peripheral blood neutrophils by gelatin and Ficoll-Hypaque methods: comparative efficiency and impact on the neutrophil oxidative metabolism and Fcy receptor expression. *J Immunol Methods*. 2014, 412, pp. 70-77.
- [71]. **van den Akker, E.L., et al.** Ficoll-separated mononuclear cells from sepsis patients are contaminated with granulocytes. *Intensive Care Med*. 2008, 34, pp. 912-916.
- [72]. **Calvano, S.E., et al.** Granulocyte contamination of Ficoll-Hypaque preparation of mononuclear cells following thermal injury may lead to substantial overestimation of lymphocyte recovery. *J Trauma*. 1988, 28, pp. 353-361.
- [73]. **Aktas, M., et al.** Separation of adult bone marrow mononuclear cells using the automated closed separation system Sepax. *Cytotherapy*. 2008, 10, pp. 203-211.
- [74]. **Khan, R., et al.** The effect of resuscitation fluids on neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock. *Shock*. 2011, 36, pp. 440-444.
- [75]. **Saudan, S.** Is the use of colloids for fluid replacement harmless in children. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2010, 23, pp. 363-367.
- [76]. **Gombocz, K., et al.** Infuence of dextran-70 on systemic inflammatory response and myocardial ischemia-reperfusion following cardiac operations. *Critical Care*. 2007, 11, pp. 1-10.
- [77]. **Alam, H.B., et al.** Effect of different resuscitation strategies on neutrophil activation in a swine model of hemorrhagic shock. *Resuscitation*. 2004, 60, pp. 91-99.

-
- [78]. **Rhee, P., Koustova, E. and Alam, H.B.** Searching for the optimal resuscitation method: recommendations for the initial fluid resuscitation of combat casualties. *J Trauma*. 2003, 54, pp. 52-62.
- [79]. **Rhee, P., et al.** Human neutrophil activation and increased adhesion by various resuscitation fluids. *Crit Care Med*. 2000, 28, pp. 74-78.
- [80]. **Welters, I.D., et al.** The effect of different volume expanders on neutrophil granulocyte function in vitro. *Anaesthesist*. 2000, 49, pp. 196-201.
- [81]. **Thomas, L.** *Labor und Diagnostik*. Frankfurt/Main : Th-Books-Verlagsgesellschaft, 2003.
- [82]. **Sachs, U.J.H. und Bux, J.** Gewinnung, Herstellung und Lagerung von Blut und Blutkomponenten. [Buchverf.] V. Kiefel. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie - Grundlagen, Therapie, Methodik*. 4. s.l. : Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2010.
- [83]. **Bryant, B.J., et al.** Gravity sedimentation of granulocytapheresis concentrates with hydroxyethyl starch efficiently removes red blood cells and retains neutrophils. *Transfusion*. 2010, 50, pp. 1203-1209.
- [84]. **Slichter, S.J., et al.** Extended storage of buffy coat platelet concentrates in plasma or platelet additive solution. *Transfusion*. 2014, 54, pp. 2283-2291.
- [85]. **Webert, K.E., et al.** Platelet utilization: a Canadian Blood Services research and development. *Transfus Med Rev*. 2014, 28, pp. 84-97.
- [86]. **Rossaint, J. and Zarbock, A.** Platelets in Leukocyte Recruitment and Function. *Cardiovasc Res*. Februar 24, 2015. (Epub ahead of print).
- [87]. **Mauler, M., Bode, C. and Duerschmied, D.** Platelet serotonin modulates immune functions. *Hamostaseologie*. Februar 19, 2015. (Epub ahead of print).
- [88]. **Stakos, D.A., et al.** Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 7. Februar 2015. (Epub ahead of print).
- [89]. **Datta, R., et al.** Hydroxyethyl starch: Controversies revisited. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2014, 30, pp. 472-480.
- [90]. **Glover, P.A., Rudloff, E. and Kirby, R.** Hydroxyethyl starch: a review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, current products and potential clinical risks, benefits and use. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2014, 24, pp. 642-661.
- [91]. **Garnacho-Montero, J., et al.** Crystalloids and colloids in critical patient resuscitation. *Med Intensiva*. Februar 12, 2015. (Epub ahead of print).
- [92]. **Hartog, C.S., et al.** Concerns over use of hydroxyethyl starch solutions. *BMJ*. 2014, 349.
- [93]. **De Hert, S. and De Baerdemaeker, L.** Why hydroxyethyl starch solutions should NOT be banned from operating room. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2014, 46, pp. 336-341.
- [94]. **Boldt, J.** Safety of nonblood plasma substitutes: less frequently discussed issues. *Eur J Anaesthesiol*. 2007, 27, pp. 495-500.
- [95]. **Jaeger, K., et al.** Effects of hydroxyethyl starch and modified fluid gelatine on phagocytic activity of human neutrophils and monocytes - results of a randomized, prospective clinical study. *Infus Ther Transfus Med*. 2000, 27, pp. 256-260.
- [96]. **Sillett, H.K., Whicher, J.T. and Trejdosiewicz, L.K.** Effects of resuscitation fluids on nonadaptive immune responses. *Transfusion*. 1997, 37, pp. 953-959.
- [97]. **Szépfolusi, Z., et al.** Human monocytes and keratinocytes in culture ingest hydroxyethylstarch. *Arch Dermatol Res*. 1993, 285, pp. 144-150.

-
- [98]. **Chang, S., et al.** Neutrophil survival on biomaterials is determined by surface topography. *J Vasc Surg.* 2003, 37, pp. 1082-1090.
- [99]. **Peltroche-Llacsahuanga, H., et al.** Simultaneous measurement of biopolymer-mediated Mac-1 up-regulation and adherence of neutrophils: a novel flow cytometric approach for predicting initial inflammatory interaction with foreign material. *J Immunol Methods.* 2001, 258, pp. 13-25.
- [100]. **Gorbet, M.B., Yeo, E.L. and Sefton, M.V.** Flow cytometric study of in vitro neutrophil activation by biomaterial. *J Biomed Mater Res.* 44, pp. 289-297.
- [101]. **Patel, J.D., Krupka, T. and Anderson, J.M.** iNOS-mediated generation of reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neutrophils. *Journal of Biomedical materials research.* 2007, 80, pp. 381-390.
- [102]. **Wuest, D.L. and Reich, L.M.** Removal of ABO-incompatible red cells from lymphocytapheresis and granulocytapheresis components before transfusion. *Transfusion.* 1997, 37, pp. 144-149.
- [103]. **Adkins, D., et al.** Hydroxyethylstarch sedimentation by gravity ex vivo for red blood cell reduction of granulocyte apheresis components. *J Clin Apher.* 1998, 13, pp. 56-61.
- [104]. **Nakagaki, K., et al.** Up-regulation of cluster of differentiation (CD) 11b expression on the surface of canine granulocytes with human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *J Vet Med Sci.* 2014, 76, pp. 1173-1176.
- [105]. **Rivest, S., et al.** How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000, 223, pp. 22-38.
- [106]. **Lichte, P., et al.** Low dose LPS does not increase TLR4 expression on monocytes in a human in vivo model. *Cytokine.* 2013, 63, pp. 74-80.
- [107]. **McCullough, J., et al.** Effect of blood-bank storage on leukocyte function. *The Lancet.* 1969, 7634, pp. 1333-1337.
- [108]. **Price, T.H. and Dale, D.C.** Neutrophil Transfusion: Effect of storage and of collection method on neutrophil blood kinetic. *Blood.* 1978, 51, pp. 789-798.
- [109]. **Hammer, M.C., et al.** Effects of storage and incubation conditions on human granulocyte phagocytic, bactericidal and chemotactic functions. *Cryobiology.* 1986, 23, pp. 525-530.
- [110]. **McCullough, J., et al.** Effects of temperature on granulocyte preservation. *Blood.* 1978, 52, pp. 301-310.
- [111]. **Lane, T.A. and Windle, B.** Granulocyte concentrate function during preservation: effect of temperature. *Blood.* 1979, 54, pp. 216-225.
- [112]. **American Association of Blood Banks.** Technical Manual 16th. Bethesda, Maryland, USA : s.n., 2008.
- [113]. **Chin-Yee, I., et al.** Supernatant from stored red cells activated neutrophils. *Transfusion Medicine.* 1998, 8, pp. 49-56.
- [114]. **Frabetti, F., et al.** White cell apoptosis in packed red cells. *Transfusion.* 1998, 38, pp. 1082-1089.
- [115]. **Frabetti, F., et al.** White cell apoptosis in platelet concentrates. *Transfusion.* 2000, 40, pp. 160-168.
- [116]. **Jank, H. and Salzer, U.** Vesicles generated during storage of red blood cells enhance the generation of radical oxygen species in activated neutrophils. *The Scientific World Journal.* 2011, 11, pp. 173-185.

- [117]. **Drewniak, Agata, et al.** Granulocyte concentrates: prolonged functional capacity during storage in the presence of phenotypic changes. 2008, 93, pp. 1058-1067.
- [118]. **Liles, W.C., Dale, D.C. and Klebanoff, S.J.** Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils. *Blood*. 1995, 86, pp. 3181-3188.
- [119]. **Höglund, M., Hakansson, L. and Venge, P.** Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. *Eur J Haematol*. 1997, 58, pp. 195-202.
- [120]. **Rex, J.H., et al.** Protection of human polymorphonuclear leukocyte function from the deleterious effects of isolation, irradiation and storage by interferon-gamma and granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion*. 1995, 35, pp. 605-611.
- [121]. **Dale, D.C., et al.** Neutrophil transfusion: kinetic and functions of neutrophils mobilized with granulocyte-colony-stimulating factor and dexamethasone. *Transfusion*. 1998, 38, pp. 713-721.
- [122]. **Chang, L., et al.** Effects of glucocorticoids on Fas gene expression in bovine blood neutrophils. *Journal of Endocrinology*. 2004, 183, pp. 569-583.
- [123]. **Ruiz, L.M., et al.** Dexamethasone inhibits apoptosis of human neutrophils induced by reactive oxygen species. *Inflammation*. 2002, 26, pp. 215-222.
- [124]. **Hubel, K., et al.** Effective storage of granulocytes collected by leukapheresis from donors stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion*. 2005, 45, pp. 1876-1889.
- [125]. **Eriksson, L., Eriksson, G. and Höglman, C.F.** Storage of buffy coat preparations at 22 °C in plastic containers with different gas permeability. *Vox Sanguinis*. 1997, 73, pp. 74-80.
- [126]. **Schwanke, U., Schrader, L. and Moog, R.** Storage of neutrophil granulocytes (PMNs) in additive solution or in autologous plasma for 72h. *Transfusion Medicine*. 2005, 15, pp. 223-231.
- [127]. **Leavey, P.J., Thurman, G. and Ambruso, D.R.** Functional characteristics of neutrophils collected and stored after administration of G-CSF. *Transfusion*. 2000, 40, pp. 414-419.
- [128]. **Lightfoot, T., Leitman, S.F. and Stroncek, D.F.** Storage of G-CSF-mobilized granulocyte concentrates. *Transfusion*. 2000, 40, pp. 1104-1110.
- [129]. **Bashir, S., et al.** Neutrophil function is preserved in a pooled granulocyte component prepared from whole blood donations. *British Journal of Haematology*. 2008, 140, pp. 701-711.
- [130]. **Mochizuki, K., et al.** Extended storage of granulocyte concentrates mobilized by G-CSF with/without dexamethasone and collected by bag separation method. *Transfusion Medicine*. 2007, 17, pp. 296-303.
- [131]. **Adkins, D.R., et al.** Effect of leukocyte compatibility on neutrophil increment after transfusion of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized prophylactic granulocyte transfusions and on clinical outcome after stem cell transplantation. *Blood*. 2000, 95, pp. 3605-3612.
- [132]. **Illerhaus, G., et al.** Treatment and prophylaxis of severe infections in neutropenic patients by granulocyte transfusions. *Annals of Haematology*. 2002, 81, pp. 273-281.
- [133]. **Dignani, M.C., et al.** Treatment of neutropenia-related fungal infections with granulocyte colony-stimulating factor-elicited white blood cell transfusions: a pilot study. *Leukemia*. 1997, 11, pp. 1621-1630.
- [134]. **Safdar, A., et al.** Impact of high-dose granulocyte transfusions in patients with cancer with candidemia: retrospective case-control analysis of 491 episodes of *Candida* species bloodstream infections. *Cancer*. 2004, 101, pp. 2859-2865.
- [135]. **Grigull, L., et al.** G-CSF mobilised granulocyte transfusions in 32 paediatric patients with neutropenic sepsis. *Support Care Cancer*. 2006, 14, pp. 910-916.

- [136]. **Alarcón, P., et al.** D-lactic acid interferes with the effects of platelet activating factor on bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011, 144, pp. 68-78.
- [137]. **Concha, C., et al.** Oxidative response of neutrophils to platelet-activating factor is altered during acute ruminal acidosis induced by oligofructose in heifers. *Journal of Veterinary Science*. 2014, 15, pp. 217-224.
- [138]. **Glasser, L., Fiederlein, R.L. and Huestis, D.W.** Liquid preservation of human neutrophils stored in synthetic media at 22 °C: controlled observations on storage variables. *Blood*. 1985, 66, pp. 267-272.
- [139]. **Lane, T.A. and Lamkin, G.E.** Defective energy metabolism in stored granulocytes. *Transfusion*. 1982, 22, pp. 368-373.
- [140]. **Lane, T.A. and Lamkin, G.E.** Hydrogen ion maintenance improves the chemotaxis of stored granulocytes. *Transfusion*. 1984, 24, pp. 231-237.
- [141]. **Keatin, F.K., et al.** Platelet-white blood cell (WBC) interaction, WBC apoptosis and procoagulant activity in stored red blood cells. *Transfusion*. 2011, 51, pp. 1086-1095.
- [142]. **Fortenberry, J.D., et al.** Neutrophil and cytokine activation with neonatal extracorporeal membrane oxygenation. *Journal of Pediatrics*. 1996, 128, pp. 670-678.
- [143]. **Esmann, L., et al.** Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: diminished proinflammatory neutrophil functions in the presence of apoptotic cells. *Journal of Immunology*. 2010, 184, pp. 391-400.
- [144]. **Godson, C., et al.** Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *Journal of Immunology*. 2000, 164, pp. 1663-1667.
- [145]. **Majno, G. and Joris, I.** Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*. 1995, 146, pp. 3-15.
- [146]. **Krysko, D.V., et al.** Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008, 44, pp. 205-221.
- [147]. **Haslett, C.** Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999, 160, pp. 5-11.
- [148]. **Cohen, J.J.** Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1999, 103, pp. 548-554.
- [149]. **Siegel, R.M., et al.** The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature Immunology*. 2000, 1, pp. 469-474.
- [150]. **O'Donnell, J.A., et al.** Fas regulates neutrophil lifespan during viral and bacterial infection. *Journal of Leukocyte Biology*. 2015, 97, pp. 321-326.
- [151]. **Cohen, J.J.** Apoptosis. *Immunology Today*. 1993, 14, pp. 126-130.
- [152]. **Akaihashi, M., et al.** Maintenance of surface antigens and the absence of an apoptotic marker are observed during storage of granulocyte concentrates collected by bag separation method. *Transfusion and Apheresis Science*. 2012, 47, pp. 43-47.
- [153]. **Hodge, G.L., Flower, R. and Han, P.** Optimal storage conditions for preserving granulocyte viability as monitored by Annexin V binding in whole blood. *Journal of Immunological Methods*. 1999, 225, pp. 27-38.
- [154]. **Lane, T.A.** Granulocyte Storage. *Transfusion Medicine Reviews*. 1990, 1, pp. 23-34.
- [155]. **Apelseth, T.O., et al.** Cytokine accumulation in photochemically treated and gamma-irradiated platelet concentrates during storage. *Transfusion*. 2006, 46, pp. 800-810.

- [156]. **Shaiegan, M., et al.** Generation of IL-8 and TNF-alpha in platelet concentrates during storage. *Archives of Iranian medicine*. 2006, 9, pp. 61-64.
- [157]. **Altrichter, J., et al.** Verfahren zum Herstellen einer Leukozytenpräparation und Leukozytenpräparation. WO2013182311A1 Deutschland, Dezember 24, 2012.
- [158]. **Altrichter, J., et al.** Method for producing a leukocyte preparation and leukocyte preparation. WO2013182311 A1 2013.
- [159]. **Valeri, C.R.** The current state of platelet and granulocyte cryopreservation. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 1981, 14, pp. 21-74.

8 wissenschaftliche Beiträge

8.1 Publikationen

Kohl, M., Koch, S., Keller, M., Deigner, H.P. Biochips: Bright Future in Clinical Dx?. *J Biochip Tissue chip*. 2011, ISSN 2153-0777.

8.2 Patente

Altrichter, J., Mitzner, S., Lübcke, A., Selleng, K., Doß, F., Koch, S. Method for producing a leukocyte preparation and leukocyte preparation. *WO2013182311*, **2012**

8.3 Poster

Koch, S., Doß, F., Doß, S., Altrichter, J., Mitzner, S. Extended storage of granulocyte concentrates for clinical transfusion. 12th Leipzig Research Festival for Life Sciences, 19. Dezember **2013**

(veröffentlicht im Abstract-Book, ISBN: 978-3-9810760-9-7)

Koch, S., Doß, F., Altrichter, J., Mitzner, S. Patented cell purification method allowing storage of purified granulocyte concentrates for 72 hours. "The Neutrophil", 31. Mai - 03. Juni **2014**

Koch, S. Patented cell purification method allowing storage of purified granulocyte concentrates for 72 hours. Science Day, 10. Juli **2014**

Koch, S., Doß, F., Altrichter, J., Mitzner, S. Patented cell purification method allowing storage of purified granulocyte concentrates for 72 hours. Fraunhofer Life Science Symposium, 09. - 10. Oktober **2014**

8.4 Vorträge

Koch, S., Doß, F., Altrichter, J., Mitzner, S. New developed cell purification method allowing storage of purified granulocyte concentrates for 72 hours. 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), 09. - 12. September **2014**

9 Anhang

9.1 Labormaterialien, Chemikalien und Reagenzien

9.1.1 Laborverbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
75T-Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Blutgas-Monovette® 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Combifix Adapter m/m	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Combifix Adapter w/w	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Countess® Cell Counting Chamber Slides	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Kryoröhrchen Nalgene® 2 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Luerschlauch w/w, steril	Gambro GmbH, Hechingen
Lumitrac 200 (96 well-Platte, weiß)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Plasmabeutel mit Luer-Anschluss MSV6000P	MacoPharma International GmbH, Langen
Plasmabeutel aus Nabelschnurblut-Set	MacoPharma International GmbH, Langen
Plasmabeutel-Set (vierfach) VQL0001XC	MacoPharma International GmbH, Langen
PP-Röhrchen, steril, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP-Röhrchen, steril, 15 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
PP-Röhrchen, steril, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP-Röhrchen, steril, 50 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Rundbodenröhrchen 5 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
S-Monovette® Lithium-Heparin 2,7 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritze, Discardit 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritze, Omnifix 30 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen, steril, 50 ml	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Thrombozytenlagerungsbeutel	Terumo BCT Europe N.V., Garching

9.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Additivlösung PAGGS-M	MacoPharma International GmbH, Langen
Adenin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Biseko® 50 g/l-Injektionslösung	Biotest AG, Dreieich
Citronensäure (1 M)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dexa 8 mg/2 ml inject	Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena
Dihydrorhodamin 123 (DHR)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck Millipore KGaA, Darmstadt

Dinatrium-EDTA-dihydrat ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca & Mg	Merck Millipore KGaA, Darmstadt
FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences GmbH, Heidelberg
Fixativ für Elektronenmikroskopie (2,5% Glutaraldehyd in 0,05 M HEPES)	Elektronenmikroskopiezentrum, Universitätsmedizin Rostock
Glucose 5-Infusionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glucosereagenz GOD-PAP / LT-SYS	LT-SYS Diagnostika GmbH, Berlin
Guanosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Heparin-Natrium-250.000 (25.000 I.E./ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm
HEPES Puffer (1 M)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Humanalbumin 20% (salzarm)	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Infukoll® HES 6 % (Mw 200.000)	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Infukoll® HES 10 % (Mw 450.000)	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
IS Mounting Medium DAPI	dianova GmbH, Hamburg
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lactatreagenz LOX-PAP	LT-SYS Diagnostika GmbH, Berlin
LDH-Reagenz IFCC	LT-SYS Diagnostika GmbH, Berlin
L-Histidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Mannitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridiniumdinitrat (Lucigenin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NaCl- Lösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
NaCl-Lösung 0,9%	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Natriumbicarbonat 8,4% (NaBic)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ringer-Infusionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
TRIS 36,34% Infusionslösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Trypanblau 0,4%	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zymosan A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

9.1.3 Antikörper für Oberflächenmarker-Analyse

Alle aufgeführten Antikörper und die notwendigen Isotypen-Kontrollen wurden von der BD Biosciences GmbH, Heidelberg bezogen.

- PE Mouse Anti-Human CD11b
- PE Mouse Anti-Human CD11c
- FITC Mouse Anti-Human CD14
- FITC Mouse Anti-Human CD16
- PE Mouse Anti-Human CD18
- FITC Mouse Anti-Human CD35
- FITC Mouse Anti-Human CD64
- PE Mouse Anti-Human CD89
- FITC Mouse Anti-Human CD95
- FITC Mouse IgG1, κ Isotype Control
- FITC Mouse IgG2a, κ Isotype Control
- FITC Mouse IgG2b, κ Isotype Control
- FITC Mouse IgM, κ Isotype Control

9.1.4 ELISA-Kits zur Zytokin-Bestimmung

Alle aufgeführten ELISA-Kits wurden von der Firma BioLegend Europe, London, Großbritannien bezogen.

- LEGEND MAX™ Human IL-1 β ELISA
- LEGEND MAX™ Human IL-6 ELISA
- LEGEND MAX™ Human IL-8 ELISA
- LEGEND MAX™ Human IL-10 ELISA
- LEGEND MAX™ Human INF- γ ELISA
- LEGEND MAX™ Human TNF- α ELISA

9.1.5 Testkits für den kombinierten Phagozytose-Oxyburst-Assay

Testkit	Hersteller
Phagotest® Phagozytose-Kit <ul style="list-style-type: none"> • Reagenz A (Waschlösung) • Reagenz B (FITC-markierte <i>E.coli</i>) • Reagenz C (Quenching-Lösung) • Reagenz D (Lyse) • Reagenz E (DNA-Färbelösung) 	Glycotope Biotechnology GmbH, Heidelberg
Phagoburst® Oxyburst-Kit <ul style="list-style-type: none"> • Reagenz B (unmarkierte <i>E.coli</i>) 	Glycotope Biotechnology GmbH, Heidelberg

9.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage 770-13	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Blutgasanalysator ABL77	Radiometer GmbH, Willich
Blutschlauch-Schweißgerät MS250	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
CO ₂ -Inkubationsschrank	BINDER GmbH, Tuttlingen
Cobas Mira Plus Analyzer	Roche Deutschland GmbH, Grenzach-Wyhlen
Countess® Automated Cell Counter	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Durchflusszytometer FACSCalibur™	Becton & Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	Manitowoc Ice, Manitowoc, WI, USA
Fluoreszenzmikroskop Eclipse Ti	Nikon GmbH, Düsseldorf
Hämatologie-Analysesystem KX-21N	Sysmex GmbH, Norderstedt
Kryo-Einfrierhilfe „Mr. Frosty“®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Laboport® Mini-Laborpumpe N86 KT.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Laborkühlschrank 4°C	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss
Lichtmikroskop DM IL LED mit Kamera-system MC120 HD	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Luminoskan Ascent RS Typ 391	Labsystems, Helsinki, Finnland
pH-Messgerät pH330	WTW GmbH, Weilheim
Photometer Anthos Reader 2010	Biochrome Ltd., Cambridge, England
Pipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Socorex Isba S.A., Ecublens, Schweiz
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Plasmaextraktor (manuell)	LMB Technologie GmbH, Schwaig
Plattenrüttler MTS 2/4 digital	IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Plattenrüttler S410	VEB MLW Labortechnik, Ilmenau
Rasterelektronenmikroskop DSM 960A	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen
Standkühlzentrifuge 8KBS	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Sterilschweißgerät TSCD® II	Terumo BCT Europe N.V., Garching
Sterilwerkbank HeraSafe® KS12	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Transmissionselektronenmikroskop Libra 120	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen
Vortex-Mischer MS1 Minishaker	IKA® Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Vortex-Mischer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Wasserbad Typ 1002	GFL GmbH, Burgwedel
Wasserbad WNB14	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg

9.3 Charakterisierung der verwendeten Standard-Granulozytenkonzentrate

Tab. 10 Charakterisierung der Granulozytenkonzentrate - Übersicht aller verwendeten Granulozytenkonzentrate - (Gesamt = Gesamtzellzahl; Phago [%] bzw. Oxy [%] = Anteil der phagozytierenden bzw. Oxyburst-aktiven Granulozyten/Monozyten; n. d. = nicht dokumentiert)

	Volumen ml	Gesamt Leukozyten $\times 10^{10}$	Gesamt Lymphozyten $\times 10^{10}$	Gesamt Monozyten $\times 10^{10}$	Gesamt Granulozyten $\times 10^{10}$	Gesamt Erythrozyten $\times 10^{12}$	Gesamt Thrombozyten $\times 10^9$	Hämatokrit [%]	Vitalität Leukozyten [%]	Phago [%]	Oxyburst [%]
1	297	2,41	0,52	0,36	1,58	0,32	124	10,5	n.d.	n.d.	n.d.
2	300	4,06	0,56	0,44	3,06	0,73	101	23,2	97,2	99,80	97,49
3	302	3,80	0,29	0,50	3,01	0,56	77	16,9	94,8	97,88	97,90
4	300	3,61	0,71	0,52	2,38	0,37	109	11,4	84,4	99,99	99,81
5	306	2,85	0,53	0,32	2,01	0,39	111	10,4	95,3	92,34	98,68
6	226	3,04	0,24	0,31	2,49	0,41	113	16,4	98,4	98,99	99,87
7	294	2,60	0,41	0,47	1,71	0,35	174	10,9	96,9	99,19	100,00
8	295	2,82	0,48	0,34	2,00	0,62	137	18,2	95,2	99,99	100,00
9	294	3,25	0,41	0,49	2,34	0,56	96	16,6	98,0	96,60	n.d.
10	260	4,90	0,32	0,21	4,37	0,43	99	15,4	94,5	n.d.	n.d.
11	300	4,92	0,53	0,45	3,94	0,77	36	22,0	93,6	93,41	97,39
12	300	4,84	0,71	0,41	3,71	0,82	86	24,0	92,6	98,53	99,91
13	322	5,53	0,28	0,48	4,77	0,90	111	26,2	93,5	86,42	100,00
14	303	3,74	0,45	0,63	2,65	0,69	94	20,7	92,8	99,24	100,00
15	295	2,20	0,24	0,37	1,59	0,66	78	20,8	92,3	99,67	99,96
16	326	4,37	0,37	0,60	3,40	1,02	94	26,4	78,0	100,00	98,85
17	311	3,82	0,37	0,46	2,99	0,40	139	12,3	90,0	98,77	100,00
18	318	3,94	0,52	0,69	2,73	0,68	101	18,5	78,0	97,86	99,81
19	308	2,34	0,25	0,38	1,71	0,69	117	20,8	65,0	98,51	99,81
20	302	3,75	0,30	0,16	3,29	0,42	138	13,5	91,0	98,50	99,96
21	312	2,97	0,42	0,39	2,16	0,35	131	9,8	93,0	97,48	99,95
22	288	3,48	0,44	0,54	2,51	0,71	103	21,0	92,0	94,54	99,86
23	308	3,98	0,81	0,46	2,71	0,34	144	10,1	81,0	99,01	99,94

Tab. 10 Charakterisierung der Granulozytenkonzentrate - Übersicht aller verwendeten Granulozytenkonzentrate (Fortsetzung) (Gesamt = Gesamtzellzahl; Phago [%] bzw. Oxy [%] = Anteil der phagozytierenden bzw. Oxyburst-aktiven Granulozyten/Monozyten; n. d. = nicht dokumentiert)

	Volumen ml	Gesamt Leukozyten $\times 10^{10}$	Gesamt Lymphozyten $\times 10^{10}$	Gesamt Monozyten $\times 10^{10}$	Gesamt Granulozyten $\times 10^{10}$	Gesamt Erythrozyten $\times 10^{12}$	Gesamt Thrombozyten $\times 10^9$	Hämatokrit [%]	Vitalität Leukozyten [%]	Phago [%]	Oxyburst [%]
24	308	2,58	0,71	0,47	1,40	0,82	75	26,0	96,0	97,30	99,93
25	306	2,44	0,36	0,24	1,84	0,62	103	17,9	95,0	99,93	99,96
26	315	2,83	0,35	0,51	1,97	1,03	86	28,3	n.d.	n.d.	n.d.
27	312	3,20	0,34	0,47	2,39	0,64	97	18,6	n.d.	n.d.	n.d.
28	317	4,22	0,57	0,41	3,23	0,89	133	25,5	91,0	99,23	99,76
29	322	4,01	0,39	0,42	3,21	0,75	41	21,2	89,0	99,36	n.d.
30	323	4,72	0,79	0,52	3,41	0,83	102	24,4	89,0	98,16	97,99
31	327	2,22	0,37	0,53	1,32	0,42	226	11,2	94,0	n.d.	n.d.
32	311	3,76	0,55	0,62	2,60	0,66	100	18,2	95,0	97,34	98,70
33	329	3,33	0,46	0,35	2,52	0,55	120	16,1	77,0	99,12	99,87
34	313	2,80	0,37	0,70	1,73	1,01	103	28,0	95,0	97,66	99,99
35	320	3,39	0,51	0,47	2,41	0,76	35	21,4	85,0	98,51	99,73
36	317	3,04	0,40	0,52	2,13	1,07	96	28,8	81,0	98,11	99,94
37	330	3,23	0,32	0,31	2,60	0,83	125	22,4	89,0	99,12	97,86
38	315	6,08	0,32	0,60	5,17	1,13	104	33,0	77,0	97,76	98,68
39	310	2,33	0,34	0,48	1,50	0,91	125	25,7	90,0	97,72	99,81
40	317	2,98	0,26	0,35	2,37	1,09	115	30,5	76,0	91,45	99,97
41	317	3,36	0,18	0,41	2,76	0,92	130	25,2	86,0	97,65	99,02
42	315	4,20	0,32	0,38	3,50	0,98	52	27,4	94,0	99,11	99,93
43	309	2,68	0,40	0,30	1,98	0,93	93	25,9	82,0	98,53	98,99
44	320	3,19	0,36	0,20	2,64	0,69	124	18,7	91,0	99,24	99,10
45	326	3,55	0,40	0,37	2,80	0,83	79	n.d.	97,0	90,36	83,66
Median	311	3,36	0,40	0,45	2,52	0,69	103	20,8	92,2	98,51	99,84
Spannweite	104	3,88	0,62	0,54	3,85	0,81	190	23,2	33,4	13,58	16,34

9.4 Stufe I - Downscaling Versuche

9.4.1 Verhältnis zwischen Granulozytenkonzentrat und Hydroxyethylstärke

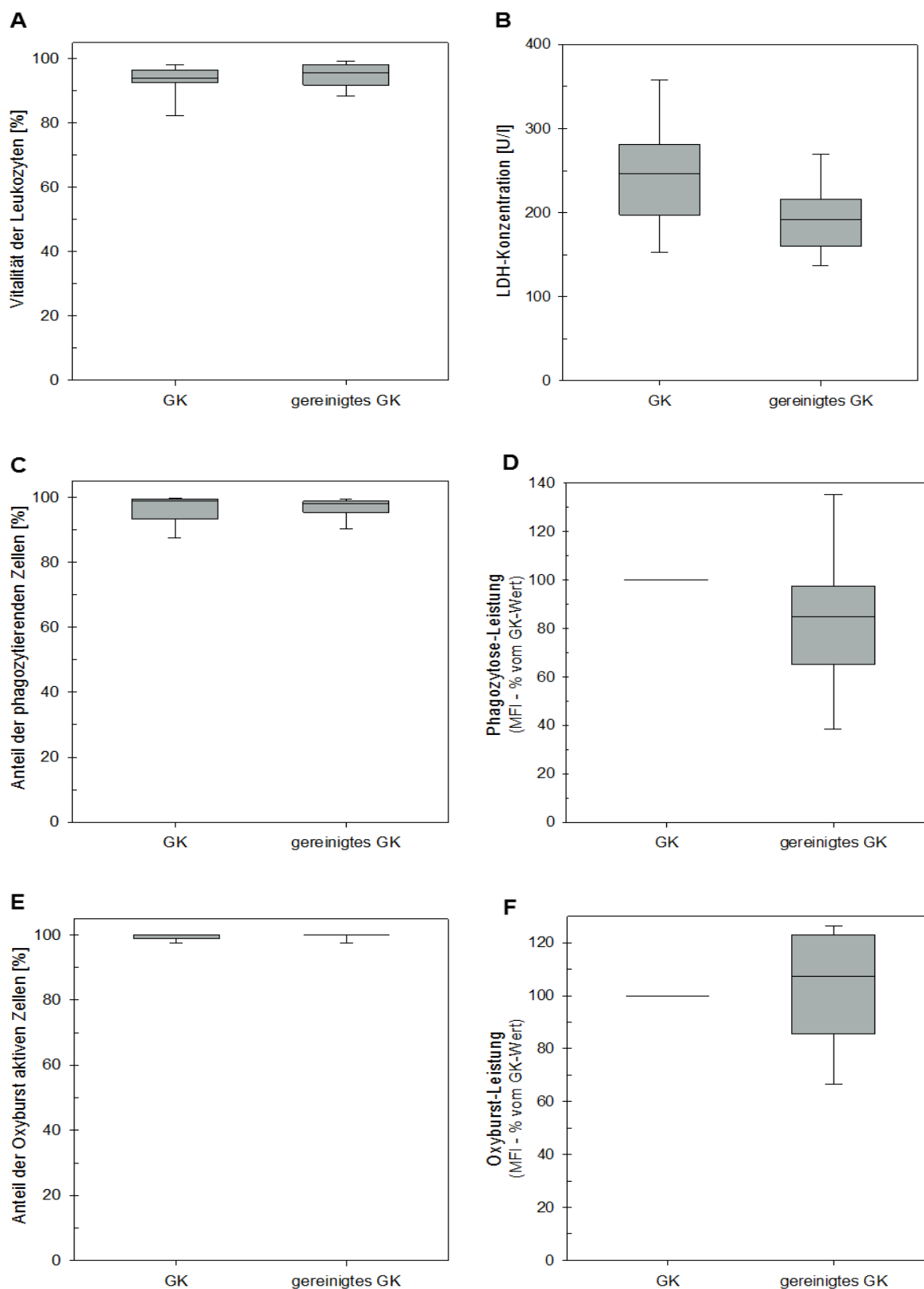


Abb. 61 (A) Vitalität der Leukozyten, (B) LDH-Konzentration, (C) Prozentualer Anteil an phagozytierenden Granulozyten und (D) deren Leistung bezogen aufs GK (100 %); (E) prozentualer Anteil an Oxyburst-aktiven Granulozyten und (F) deren Oxyburst-Leistung bezogen aufs GK (100 %) nach der Aufreinigung (n = 12; Signifikanzen bezogen aufs GK als $p > 0,05$ getestet)

9.5 Stufe II - Upscaling-Versuche

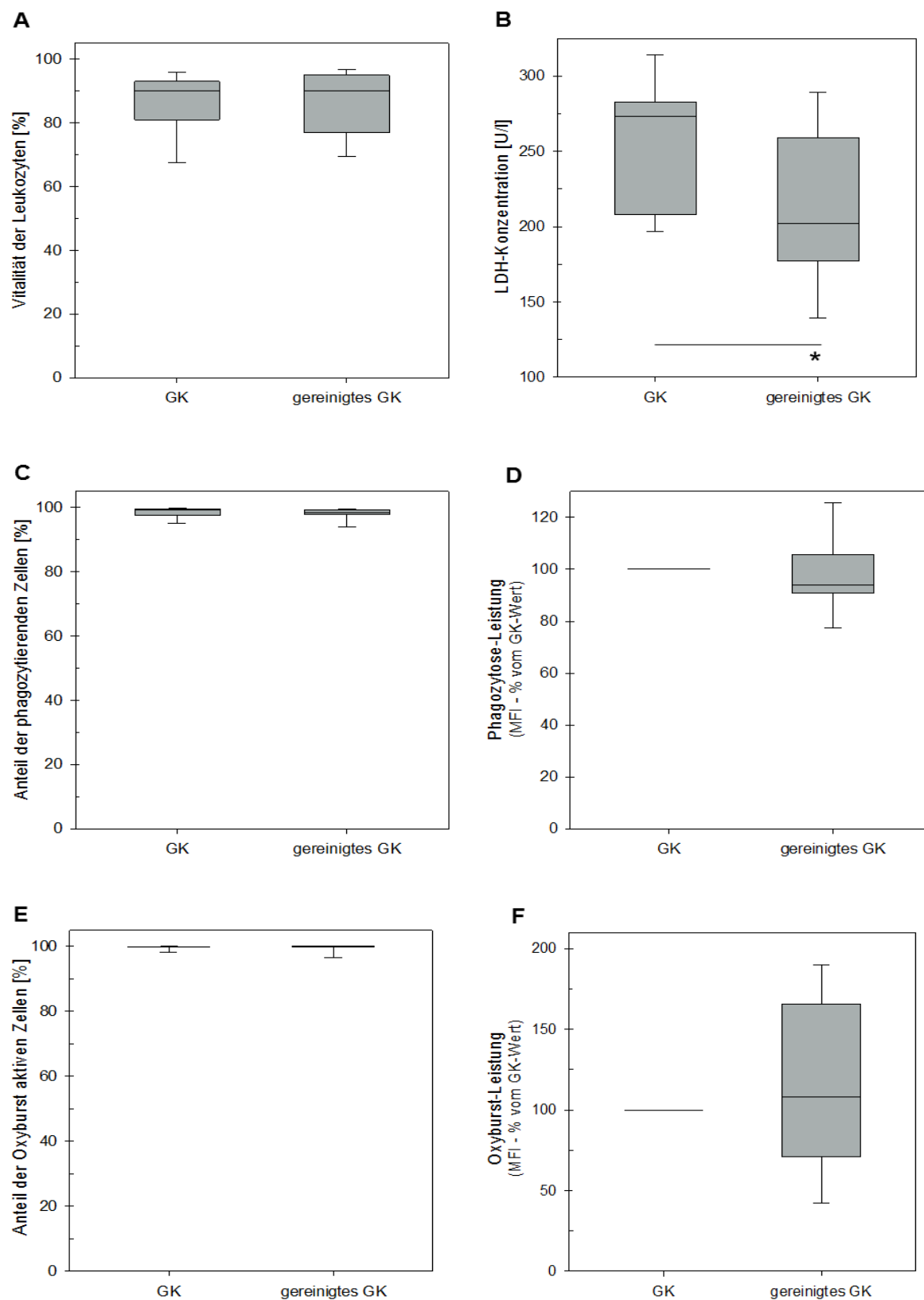


Abb. 62 (A) Vitalität der Leukozyten, (B) LDH-Konzentration, (C) Prozentualer Anteil an phagozytierenden Granulozyten und (D) deren Leistung bezogen aufs GK (100 %); (E) prozentualer Anteil an Oxyburst-aktiven Granulozyten und (F) deren Oxyburst-Leistung bezogen aufs GK (100 %) nach der Aufreinigung mit Sedimentation direkt im Spendenbeutel (n = 11; Signifikanzen bezogen auf GK getestet; *p < 0,05 bezogen auf durch waagerechte Linien gekennzeichnete Vergleichspaare)

9.6 Vergleich zwischen unfiltriertem und filtriertem CPD-Plasma als Lagerungsmedium

9.6.1 Vergleich der Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD18, CD35, CD64 und CD89 während der Lagerung

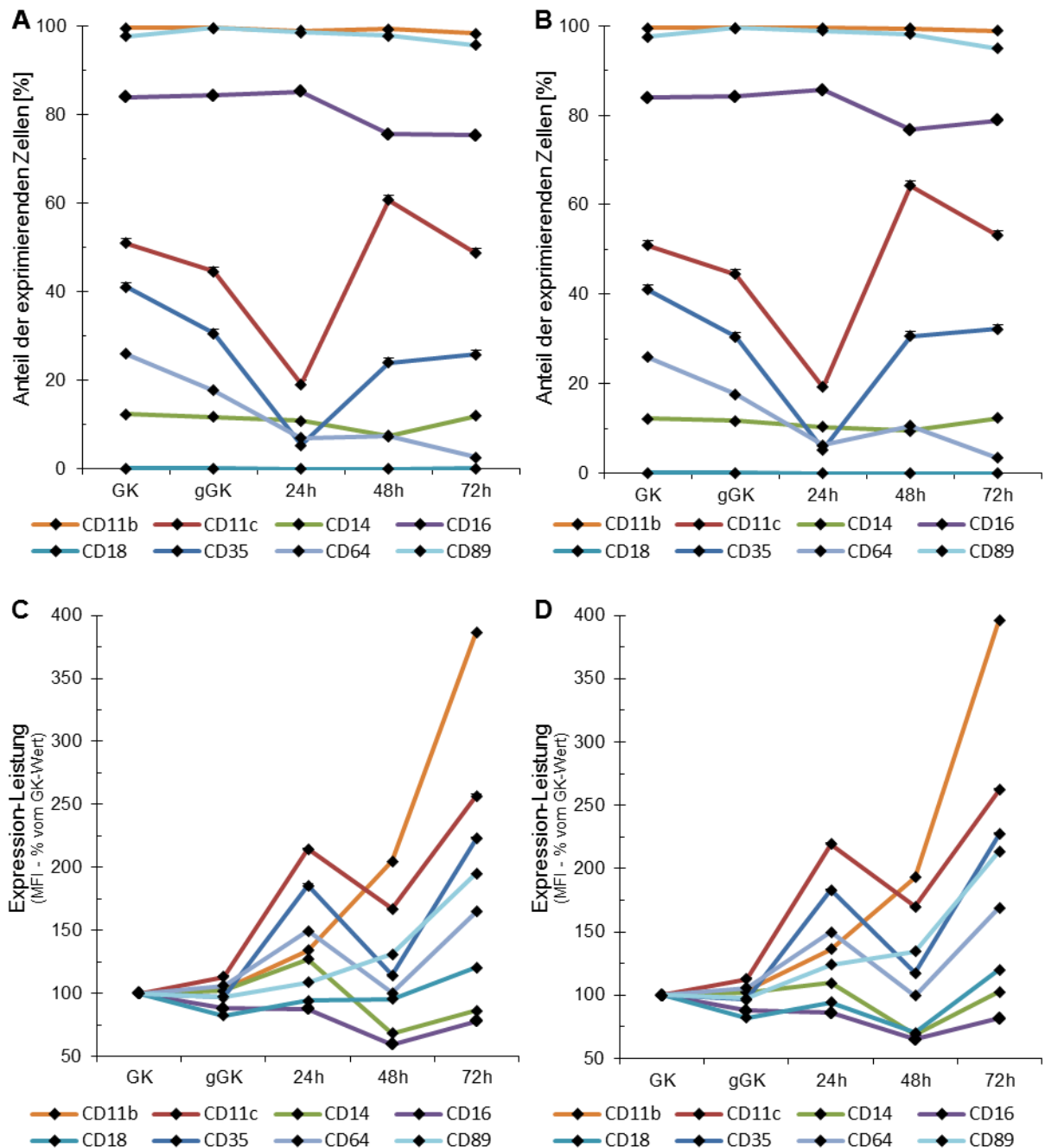


Abb. 63 Anteil der Granulozyten, die Oberflächenmarker exprimieren bei der Lagerung mit (A) unfiltriertem bzw. (B) filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden und die Menge der exprimierten Oberflächenmoleküle bezogen auf das GK bei der Lagerung mit (C) unfiltriertem bzw. (D) filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 1; MFI = mean fluorescence intensity)

9.6.2 Vergleich der Expression des Oberflächenmoleküls CD95 während der Lagerung (Apoptose)

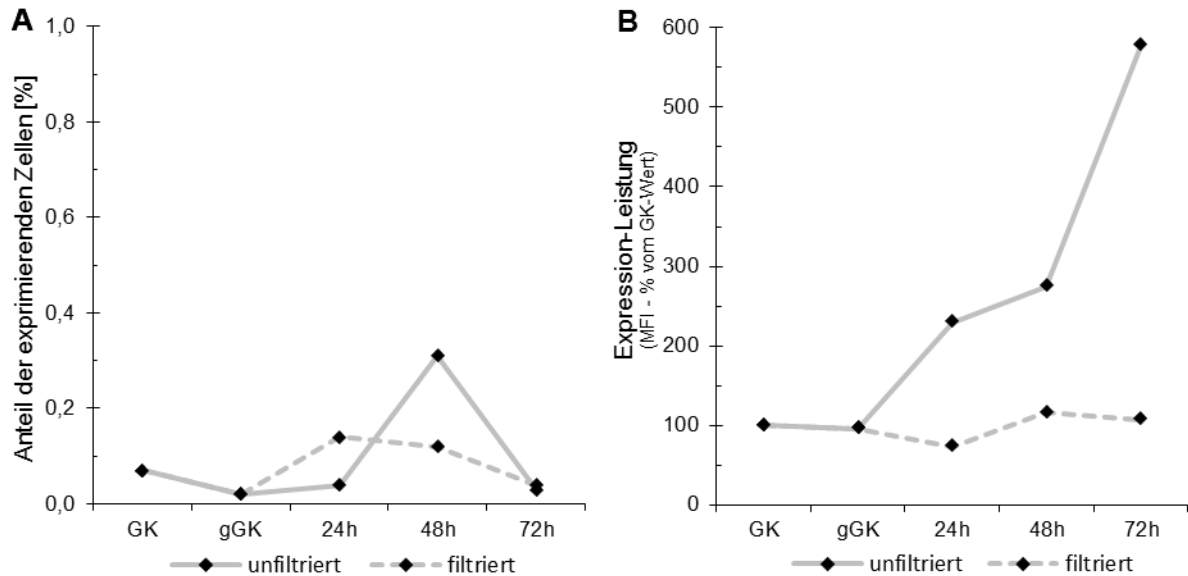


Abb. 64 (A) Anteil der CD95 exprimierenden Granulozyten bei der Lagerung mit unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden und (B) die Menge des exprimierten Oberflächenmoleküls CD95 bezogen auf das GK bei der Lagerung mit unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 1; MFI = mean fluorescence intensity)

9.6.3 Vergleich der Sekretion ausgewählter Zytokine während der Lagerung

Tab. 11 Zusammenfassung der Plasmakonzentrationen [pg/ml] für die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, INF- γ und TNF- α während der Lagerung in unfiltriertem bzw. filtriertem CPD-Plasma über 72 Stunden (n = 4; angegeben sind der Median und die Spannweite in Klammern; Signifikanzen der einzelnen Zeitpunkte und im Verlauf getestet; *p < 0,05 für 0h vs. 72h)

		IL-1 β	IL-6	IL-8	IL-10	INF- γ	TNF- α
GK		7,6 (51,4)	69,5 (93,3)	35,0 (29,5)	0,0 (0,0)	49,1 (35,2)	15,8 (8,0)
gGK		2,6 (60,4)	66,7 (158,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	53,6 (72,5)	29,7 (8,5)
0h	unfiltriert	1,6 (72,6)	39,6 (96,4)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	30,2 (39,3)	30,9 (35,2)
	filtriert	3,1 (63,0)	72,9 (143,45)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	50,1 (77,6)	37,2 (1,8)
24h	unfiltriert	2,2 (50,4)	71,1 (197,2)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	28,2 (53,8)	24,7 (22,5)
	filtriert	2,3 (4,6)	81,1 (452,3)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	34,5 (95,5)	24,8 (14,5)
48h	unfiltriert	11,7 (156,0)	150,3 (132,4)	752,4 (495,1)	6,3 (1,0)	46,4 (51,2)	21,1 (5,7)
	filtriert	13,6 (165,0)	191,4 (184,8)	909,8 (941,9)	11,6 (0,8)	26,9 (39,5)	26,9 (12,0)
72h	unfiltriert	331,4 (317,8)	1567,9* (1763,9)	4619,5* (419,8)	9,9 (5,4)	48,6 (37,5)	22,5 (5,3)
	filtriert	330,9 (323,2)	1566,2* (1738,9)	4617,8* (410,7)	9,2 (8,2)	43,8 (40,7)	28,8 (1,6)

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Universitätsmedizin der Universität Rostock zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**„Verbesserung der Reinheit und der Lagerung phagozytierender Zellen aus
Blutspenden zur Anwendung in der Humanmedizin“**

selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in dieser Schrift angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit bisher bei keiner anderen als der genannten Fakultät zur Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Stephanie Koch